

NACHWEIS DES FC γ RIIA-POLYMORPHISMUS BEI PATIENTEN MIT AGGRESSIVER PARODONTITIS (AP) UND EINER PARODONTAL GESUNDEN KONTROLLGRUPPE MITTELS ALLELSPEZIFISCHER PCR

ACHIM ROLL

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Nachweis des FcγRIIa-Polymorphismus bei Patienten mit
aggressiver Parodontitis (AP) und einer parodontal gesunden
Kontrollgruppe mittels allelspezifischer PCR**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Achim Roll
aus Forbach

Giessen 2008

Aus dem Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Poliklinik für Parodontologie
der Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Standort Giessen

Direktor: Prof. Dr. J. Meyle

Gutachter: Prof. Dr. J. Meyle

Gutachter: Frau Prof. Dr. D. Nolte

Tag der Disputation: 22.06.2009

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1. Klassifikation der Parodontitis	3
2.2. Die aggressive Parodontitis (AP)	6
2.3. Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis.....	8
2.4. Der FcγRIIa-Polymorphismus	23
2.4.1. Der Fcγ-Rezeptor	23
2.4.2. Polymorphismus von FcγRIIa.....	24
2.4.3. FcγRIIa, IgG ₂ und aggressive Parodontitis	25
2.4.4. Genetische Analyse des FcγRIIa-Polymorphismus mittels PCR.....	28
3. ZIELE DER STUDIE	30
4. MATERIAL UND METHODEN	32
4.1. Studienprotokoll.....	32
4.2. Klinische und radiologische Untersuchungsmethoden.....	32
4.3. Gruppeneinteilung	34
4.4. Ein- und Ausschlusskriterien	35
4.5. Entnahme und Weiterverarbeitung von Blut.....	36
4.6. Isolation der genomischen DNA.....	37
4.7. Nachweis des FcγRIIa-Polymorphismus mittels PCR	38
4.7.1. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	38
4.7.2. Verwendete Materialien	38
4.7.3. Vorgehen bei der PCR.....	39
4.7.4. Nachweismethode für das 131R-Allel	40
4.7.5. Nachweismethode für das 131H-Allel	43
4.7.6. Gelelektrophorese.....	48
4.8. Sequenzierung der PCR-Produkte	49
4.9. Statistische Auswertung.....	50
5. ERGEBNISSE	51
5.1. Nachweis der Allele 131R und 131H mit allelspezifischen Primern.....	52
5.2. Ergebnisse der Sequenzierung der PCR-Produkte.....	54

5.3. Verteilung der FcγRIIa-Genotypen und Häufigkeit der Allele.....	55
5.4. Klinische Parameter.....	58
5.4.1. Alter.....	58
5.4.2. Plaqueindex (PI).....	59
5.4.3. Papillenblutungsindex (PBI)	60
5.4.4. Sondierungstiefe (ST)	61
5.4.5. Sondierungsblutung (SB)	62
5.4.6. Klinischer Attachmentlevel (AL).....	63
5.4.7. Klinische Daten der Probanden und Patienten	64
5.4.8. Klinische Daten und FcγRIIA-Genotypen	64
 6. DISKUSSION	 66
6.1. Nachweismethode für den FcγRIIa-Polymorphismus	66
6.2. FcγRIIa-Genotypverteilung und Allelhäufigkeit.....	71
6.3. Klinische Parameter.....	77
6.4. Schlussfolgerungen.....	78
 7. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	 79
 8. LITERATURVERZEICHNIS	 82
 9. ANHANG	 106
9.1. Verzeichnis der Abbildungen.....	106
9.2. Verzeichnis der Tabellen	106
9.3. Erklärung.....	107
9.4. Lebenslauf	108
9.5. Danksagung.....	109

1. Einleitung

Bei der Parodontitis handelt es sich um eine multifaktoriell bedingte entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, die in erster Linie durch Bakterien verursacht wird. Im Hinblick auf Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis spielen aber neben den pathogenen Bakterien und der Mundhygiene auch Risikofaktoren eine entscheidende Rolle. Diese Risikofaktoren sind in der Lage, jeden einzelnen Teilschritt der Pathogenese zu beeinflussen, was somit individuell zu unterschiedlichen Erscheinungsformen dieser Krankheit führen kann. Hierzu zählen neben Stress, Rauchen und systemischen Erkrankungen auch genetische Faktoren.

Vor Jahren wurde schon in mehreren Arbeiten publiziert, dass genetische Faktoren eine Rolle bei der Parodontitis spielen (Hart & Kornman 1997; Hassell & Harris 1995; Michalowicz 1994; Nevins & Nevins 1998).

Viele Gene verursachen durch Mutationen verschiedene Varianten des individuellen Genotyps, ohne nun als besonders selten oder abnorm zu gelten. Dies wird als genetischer Polymorphismus bezeichnet.

Ein Polymorphismus des Fc γ RIIa-Rezeptors (rs1801274) ist bedingt durch einen einfachen Basenaustausch (A \rightarrow G), der zu einem Aminosäureaustausch in Position 131 (Histidin \rightarrow Arginin) führt (Warmerdam et al. 1990). Daraus ergeben sich zwei polymorphe Formen Fc γ RIIa-131H und Fc γ RIIa-131R, die sich in ihrer Affinität an menschliches IgG₂ unterscheiden, was eine unterschiedliche Immunantwort bei bakteriellen Infektionen zur Folge hat (Warmerdam et al. 1991).

Außer diesem Polymorphismus des *Fc γ RIIA*-Gens sind inzwischen mindestens 30 weitere bekannt, wobei bei 6 dieser Polymorphismen unterschiedliche Aminosäuren im Fc γ RIIa –Protein eingebaut werden.

Mit einigen Erkrankungen, die ihre Ursache in einer bakteriellen Infektion haben, kann dieser Fc γ RIIa-Polymorphismus schon eindeutig in Verbindung gebracht werden. Einige Studien belegen diesen Sachverhalt (Arepally et al. 1997; Blasini et al. 1993; Porges et al. 1994; Yee et al. 1997). Daher liegt die Vermutung nahe, dass dieser Polymorphismus auch einen Einfluss auf die aggressive Parodontitis (AP) haben könnte.

Zahlreiche Polymorphismen werden heute mit den unterschiedlichsten Erkrankungen assoziiert. Auch in der Parodontitisforschung hat man diese Zusammenhänge erkannt.

Kornman et al. (1997) haben mit ihrer Arbeit „The interleukin-1-genotype as a severity factor in adult periodontal disease“ den Anstoß zu vielen nachfolgenden Studien auf diesem Gebiet gegeben.

Bei den meisten Studien finden sich unter den Trägern mit Mutationen auf einem oder mehreren Allelen wesentlich mehr Probanden mit schweren Formen der Parodontitis als dies bei Trägern ohne Mutationen der Fall ist. Die schweren Formen der Parodontitis werden heute unter dem Terminus aggressive Parodontitis (AP) zusammengefasst.

Wilson & Kalmar (1996) vermuteten schon vor Jahren, dass zwischen dem FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) und einer lokalisierten Form der aggressiven Parodontitis ein Zusammenhang in Bezug auf die Anfälligkeit für diese Erkrankung besteht.

Um schon frühzeitig im Rahmen von Screenings das individuelle Parodontitisrisiko festlegen zu können, ist es wichtig, auch über das eventuelle Vorhandensein genetischer Risikofaktoren Bescheid zu wissen.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwiefern die Vermutungen von Wilson & Kalmar (1996) für Patienten mit aggressiver Parodontitis (AP-Patienten) im Vergleich zu einer parodontal gesunden Kontrollgruppe zutreffend sind. Hierfür soll ein einfaches System zum Nachweis des FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) bei Patienten mit aggressiver Parodontitis (AP) angewendet werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Klassifikation der Parodontitis

Im Jahre 1988 wurde von der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) zum eine Neufassung der Nomenklatur marginaler Parodontopathien veröffentlicht. Aufgrund des wissenschaftlichen Fortschritts und der Gewinnung zahlreicher neuer Erkenntnisse in der Parodontitisforschung wurde es nötig, eine Korrektur der vorhandenen Nomenklatur und Klassifikation vorzunehmen, um den neuen Erkenntnissen Rechnung zu tragen. Auf einem Workshop in Oakbrook 1999 wurde eine neue Klassifikation der Parodontalerkrankungen erarbeitet und verabschiedet (Armitage 1999). Diese neue Klassifizierung sollte zum einen die aktuellen Erkenntnisse der Pathogeneseforschung, zum anderen die der Risikoanalytik der zurückliegenden 15 Jahre berücksichtigen und außerdem das gesamte Spektrum pathologischer Veränderungen erfassen.

Zur Klassifizierung der Parodontitis werden die klinischen Parameter Attachment- und Alveolarknochenverlust, Taschenbildung und Entzündungszustand herangezogen.

Die neue Klassifizierung der Parodontalerkrankungen (Armitage 1999; Deutsche Gesellschaft für Parodontologie 2002) besteht aus 8 Hauptkategorien, die durch Spezifizierungen nochmals weiter unterteilt werden:

I.) Gingivale Erkrankungen

Hierunter fallen all die Erkrankungen, die ausschließlich die Gingiva, nicht aber das übrige Parodontium betreffen. Die Gingivitis wird nicht mehr als eine einzelne Erkrankung, sondern als ein Spektrum von gingivalen Erkrankungen, die das Endergebnis des Ablaufs verschiedener pathologischer Prozesse an der Gingiva repräsentieren, verstanden.

Die gingivalen Erkrankungen werden in plaque-induzierte und nicht plaque-induzierte gingivale Erkrankungen unterteilt.

II.) Chronische Parodontitis (CP)

Die chronische Parodontitis ist eine Infektionskrankheit, die zu einer Entzündung des Zahnhalteapparates sowie progressivem Attachment- und Knochenverlust führt. Sie ist

durch Bildung von Zahnfleischtaschen und/oder Gingivarezessionen gekennzeichnet und stellt die am meisten vorkommende Form der Parodontitis dar.

Die chronische Parodontitis kann nach Ausmaß und Schwere unterteilt werden in:

- a.) Lokalisierte Form (weniger als 30% der Zahnflächen befallen)
- b.) Generalisierte Form (mehr als 30% der Zahnflächen befallen)

III.) Aggressive Parodontitis (AP)

Die AP stellt eine Krankheitsform mit überwiegend klar erkennbaren klinischen Merkmalen und speziellen Befunden hinsichtlich der Wirt-Bakterien-Interaktion dar. Folgende Hauptmerkmale sind zu beachten: Der Patient ist klinisch gesund und weist eine rasch fortschreitende Gewebedestruktion auf. Auffällig ist die familiäre Häufung dieser Parodontitisform.

Auch die AP kann weiter unterschieden werden in:

- a.) Lokalisierte Form (Beginn während der Pubertät, erste Molaren und Schneidezähne befallen)
- b.) Generalisierte Form (Patienten meist jünger als 30 Jahre, mindestens 3 Zähne sind außer den ersten Molaren und Schneidezähnen befallen, deutlicher episodenhafter Verlauf)

IV.) Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen

Hierunter fallen verschiedene Allgemeinerkrankungen, die über die Beeinflussung der Wirtsreaktivität das individuelle Parodontitisrisiko erhöhen, nicht aber zu einer spezifischen Parodontitis führen. Dazu zählen:

- a.) Bluterkrankungen (erworbene Neutropenie, Leukämie und andere)
- b.) Genetische Störungen (Down-Syndrom etc.)
- c.) Nicht anderweitig spezifiziert

V.) Nekrotisierende Parodontalerkrankungen

- a.) Nekrotisierende ulzerierende Gingivitis (NUG)

Sie stellt eine Infektion dar, die durch gingivale Nekrosen, gingivale Blutung und Schmerz charakterisiert ist. Foetor ex ore und Pseudomembranen können sekundäre diagnostische Merkmale sein.

- b.) Nekrotisierende ulzerierende Parodontitis (NUP)

Sie ist gekennzeichnet durch Nekrosen des gingivalen Gewebes, des Desmodonts und des Alveolarknochens. Derartige Läsionen werden am häufigsten bei Individuen mit systemischen Erkrankungen einschließlich schwerer Unterernährung und Immunsuppression und insbesondere bei HIV vorgefunden.

VI.) Abszesse des Parodonts

Die Klassifikation der Abszesse richtet sich nach der Lokalisation der Infektion. Man unterscheidet in Gingivaabszess, Parodontalabszess und Perikoronarabszess.

VII.) Parodontitis im Zusammenhang mit endodontischen Läsionen

VIII.) Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände

a.) Lokalisierte zahnbezogene Faktoren, welche die Plaqueretention begünstigen.

Diese Faktoren können in bestimmten Fällen den Beginn einer parodontalen Erkrankung begünstigen, stellen aber keine eigenständige Erkrankung dar.

b.) Mukogingivale Verhältnisse, zum Beispiel Rezessionen usw.

c.) Schleimhautveränderungen auf zahnlosen Alveolarkämmen

d.) Okklusales Trauma

Als okklusales Trauma wird per definitionem eine Gewebeveränderung des Zahnhalteapparates als Ergebnis okklusaler Kräfte bezeichnet. Es wird weiter zwischen primärem und sekundärem okklusalem Trauma unterschieden. Bei einem primären okklusalen Trauma treten die Gewebeveränderungen bei einem Zahn oder Zähnen mit normalem Zahnhalteapparat auf, wohingegen bei einem sekundären okklusalen Trauma an den betroffenen Zähnen bereits ein reduziertes Parodont vorhanden ist.

2.2. Die aggressive Parodontitis (AP)

Der Begriff der aggressiven Parodontitis existiert seit 1999 (siehe 2.1) und ersetzt die bisherigen Termini „früh beginnende Parodontitis“ (early onset periodontitis (EOP)) und „rasch progrediente Parodontitis“ (RPP). Dadurch wird gleichzeitig der Terminus „lokalisierte juvenile Parodontitis“ (LJP) durch den der lokalisierten aggressiven Parodontitis und „generalisierte juvenile Parodontitis“ (GJP) durch den der generalisierten aggressiven Parodontitis ersetzt.

Bei der AP handelt es sich um eine Krankheitsform mit überwiegend klar erkennbaren klinischen Merkmalen und speziellen Befunden hinsichtlich der Wirt-Bakterien-Interaktion (Deutsche Gesellschaft für Parodontologie 2002).

Tonetti & Mombelli (1999) bezeichnen die AP als Syndrom, bei dem mehrere pathologische Bedingungen zum Verlust parodontaler Strukturen in jungem Alter führen.

Die AP wird nach verschiedenen Kriterien definiert. Dazu zählen die Beziehung zu systemischen Faktoren, das Alter des Patienten bei Ausbruch der Krankheit und dessen zeitlicher Beziehung zur Pubertät und damit verbundener Hormonumstellung, Einbeziehung der Milchzähne und der bleibenden Zähne, Ausmaß und Schweregrad, Progressionsrate und die Reaktion auf die erfolgte Therapie.

Lang et al. (1999) beschreiben folgende Hauptmerkmale für die AP: Der Patient ist klinisch gesund, weist jedoch eine rasch voranschreitende Gewebedestruktion auf. Besonders auffällig bei der aggressiven Parodontitis ist die familiäre Häufung.

Neben diesen Hauptmerkmalen gibt es auch noch Merkmale, die nicht durchgängig zu beobachten sind. Dazu zählen das Missverhältnis zwischen der Menge der bakteriellen Ablagerungen und dem Ausmaß der Gewebedestruktion, erhöhte Zahlen von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.) (früher *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) und unter Umständen auch von *Porphyromonas gingivalis*, eine abnormale Phagozytenfunktion, ein hyperresponsiver Makrophagen-Genotyp mit einer erhöhten Produktion von PgE₂ und IL1- β sowie eine mögliche Selbstlimitierung der Gewebedestruktion (Deutsche Gesellschaft für Parodontologie 2002; Lang et al. 1999).

Die AP existiert in einer lokalisierten und generalisierten Form, die sich in einigen Gesichtspunkten bezüglich der Ätiologie und Pathogenese unterscheiden (Lang et al. 1999).

Heute ist klar, dass die lokalisierte AP keine lokalisierte Form der generalisierten AP ist, da es verschiedene spezifische klinische und die Immunantwort betreffende Unterschiede zwischen der lokalisierten und der generalisierten AP gibt (Armitage 2004).

Man vermutet, dass die altersabhängige Progression der lokalisierten in die generalisierte Form entweder durch spezifische Pathogene oder durch erhöhte umweltbedingte oder genetisch bedingte Anfälligkeit erklärt werden kann (Tonetti & Mombelli 1999).

Die lokalisierte Form bricht ungefähr zum Zeitpunkt der Pubertät aus oder wird während der Pubertät entdeckt und diagnostiziert, wohingegen die generalisierte Form gewöhnlich bei Personen unter 30 Jahren entdeckt und diagnostiziert werden kann. Manche Patienten können aber auch durchaus älter als 30 Jahre sein.

Die lokalisierte AP ist gekennzeichnet durch eine starke Serum-Antikörperreaktion gegen Parodontopathogene und dem Befall der Inzisivi und der ersten Molaren mit interproximalem Attachmentverlust bei mindestens zwei bleibenden Zähnen. Davon ist immer einer ein Molar. Patienten mit einer generalisierten AP weisen dagegen eine sehr schlechte Antikörperreaktion auf und zeigen einen sehr starken Attachment- und Alveolarknochenverlust an mindestens drei bleibenden Zähnen außer der Inzisivi und ersten Molaren (Lang et al. 1999).

Die Mikroflora, die mit der AP assoziiert wird, besteht hauptsächlich aus gram-negativen, kapnophilen und anaeroben Stäbchen (Newman & Socransky 1977; Slots 1979). Eine große und wichtige Rolle bei der AP spielt *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.), ein gram-negativer, nichtmotiler Kokkobazillus. Die Beziehung bzw. der enge Zusammenhang zwischen A.a. und der AP und die Rolle, die dieser Keim für die AP spielt, ist vielfach in der Literatur beschrieben und dokumentiert worden (Kornman & Robertson 1985; Newman & Socransky 1977; Slots et al. 1980; Slots et al. 1982; Zambon 1985).

In mehreren Veröffentlichungen wird über Chemotaxis- und Phagozytosedefekte der neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit aggressiver Parodontitis berichtet (Clark et al. 1977; Kimura et al. 1992; Suzuki et al. 1984; Van Dyke et al. 1987), was den

aggressiven Verlauf dieser Erkrankung und die massiven Destruktionen des Parodonts mit erklären könnte.

Die AP tritt wesentlich seltener auf als die chronische Parodontitis, die die häufigste Form der Parodontitis darstellt (Albandar & Tinoco 2002). Schätzungen über die Prävalenz der AP variieren zwischen 0,1% und 15% (Hart et al. 1993; Loe & Brown 1991; Neely 1992; Saxen 1980a; Saxen 1980b; Sjodin et al. 1993), wobei die Unterschiede verschiedenen Kriterien, der geografischen Region und einer unterschiedlichen Datenbank zuzuschreiben sind. Untersuchungen zeigen aber deutlich eine größere Prävalenz bei Schwarzen als bei Europäern (Burmeister et al. 1984; Loe & Brown 1991; Melvin et al. 1991).

2.3. Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis

Als Parodontopathien werden allgemein die entzündlichen Erkrankungen des Zahnhalteapparates bezeichnet. Mit Ausnahme der Gingivitis, die ohne irreversible Folgen am Parodontium über Jahre bestehen kann, führen diese Erkrankungen zu einem Abbau des alveolären Knochens und der desmodontalen Fasern. Dies führt im fortgeschrittenen Stadium zu Zahnlockerung und Zahnverlust (Schroeder 1997).

Die Erkenntnis über die entzündliche Natur der Erkrankungen drückt sich auch im Wandel der Krankheitsbezeichnung von „Parodontose“, wie sie in der deutschen Bevölkerung noch weit verbreitet ist, zu „Parodontitis“, der heute gültigen klinischen Bezeichnung, aus.

Trotz aller Bemühungen der letzten Jahrzehnte ist die Parodontitis eine Erkrankung mit unvollständig geklärter Ätiologie (Hardie 1992).

Obwohl bereits schon der arabische Arzt Rhazas (850-923 v. Chr.) in seiner Abhandlung Albucasis (963-1013 v. Chr.) eine Beziehung zwischen Parodontitis und Ablagerungen auf Zähnen herstellte und sowohl Fouchard 1728 als auch Pasch 1767 die Reinigung der Zähne als Parodontaltherapie empfohlen hatten (Poessel 1939), wurde der Zusammenhang zwischen entzündlichen Erkrankungen der zahntragenden Strukturen und bakteriellen Belägen erst vor ca. 40 Jahren durch die klassische Studie zur experimentellen Gingivitis von Loe et al. (1965) im heutigen Sinne der Wissenschaft bewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass der Auslöser für die Entstehung einer Gingivitis die Anhäufung bakterieller Plaque ist, wobei die Gingivitis durch

gezielte Behandlung und Mundhygiene wieder vollständig und ohne irreversible Schäden ausheilt.

Lindhe et al. (1973) führten eine ähnliche Studie zur experimentellen Parodontitis durch und konnten auch hier den Zusammenhang zwischen bakterieller Plaque und der Erkrankung nachweisen.

Lange Zeit betrachtete man die entzündlichen Parodontalerkrankungen als unspezifische Infektionskrankheit und entwickelte auch auf der Grundlage der Studie von Loe et al. (1965) die unspezifische Plaquehypothese, wobei für die Pathogenität der bakteriellen Plaque primär deren Quantität verantwortlich gemacht wurde (Moore et al. 1982; Theilade 1986). Gestützt wird diese Hypothese von Untersuchungen, in denen Therapieerfolge mit der Intensität unspezifischer Kontrolle der Plaque korrelieren.

Die Schwere des klinischen Erscheinungsbildes der Parodontitis geht bereits nach der einleitenden Hygienephase der Parodontaltherapie signifikant zurück (Morrison et al. 1980).

Da sich aber nicht bei allen an Parodontitis erkrankten Personen selbst bei optimaler Mundhygiene und regelmäßigem Recall ein dauerhafter Therapieerfolg erzielen lässt (Magnusson & Walker 1996) und sich die akuten Entzündungen und typischen Läsionen bei der AP statistisch nicht mit der Anhäufung bakterieller Plaque in Verbindung bringen lassen, wurden Zweifel an der Allgemeingültigkeit der unspezifischen Plaquehypothese laut.

Durch die zunehmende Erkenntnis, dass sich die Zusammensetzung der bakteriellen Plaque bei verschiedenen Formen parodontaler Erkrankungen qualitativ unterscheidet, gewann die spezifische Plaquehypothese an Bedeutung.

Diese macht eine qualitative Veränderung der Plaque und das Überwuchern von parodontalpathogenen Keimen als Auslöser der entzündlichen Reaktion verantwortlich (Tanner 1988).

Besonders die Untersuchungen von Slots in den 1970er und 1980er Jahren erbrachten den Nachweis, dass sich die qualitative Zusammensetzung der Bakterienflora wie auch das quantitative Verhältnis der Bakterienspezies zueinander je nach Schweregrad der parodontalen Entzündung verändert, und nur bestimmte virulente Keime eine Parodontitis verursachen können (Slots 1977a; Slots 1977b; Slots 1979; Slots 1986).

Die Grundprinzipien der Pathogenese der Parodontitis wurden durch Page & Schroeder (1976) ausführlich beschrieben. Diese Grundprinzipien haben zwar noch immer ihre

Gültigkeit, jedoch hat man heute detailliertere Vorstellungen über molekulare und zelluläre Mechanismen, die die Stärke und Balance der zellulären und humoralen Wirtsantwort im Gewebe bestimmen (Kornman et al. 1997b; Page et al. 1997).

Wie schon erwähnt, liegt der erste Schritt sowohl bei der Entstehung der Gingivitis als auch der Parodontitis in der Anhäufung bakterieller Plaque.

Unter der Bezeichnung Plaque versteht man einen bakteriellen Biofilm. Dieser wird als matrixeinschließende Bakterienpopulation, die aneinander selbst und an anderen Oberflächen haftet, angesehen (Costerton et al. 1994).

Man unterscheidet entsprechend ihrer Eigenschaften, Charakteristik und Zusammensetzung zwei verschiedene Biofilmtypen, die supra- und die subgingivale Plaque.

Die supragingivale Plaque besteht noch weitgehend aus gram-positiven aeroben nichtmotilen Stäbchen und Kokken.

Durch Proliferation am apikalen Rand dieser Plaque kann sich diese nach subgingival ausbreiten, wodurch die Taschenbildung eingeleitet wird und eine gingivale Tasche entsteht.

Die Taschenbildung ist das Resultat des Zusammenwirkens von bakterieller Proliferation, subgingival gerichteter Ausdehnung der bakteriellen Plaque und der entzündlichen Exsudation (Takata & Donath 1988).

Die subgingivale Plaque liegt geschützt im gingivalen Sulkus, wodurch einerseits der Beginn der Wirtsreaktion und andererseits der Raum, den der Sulkus bildet, die limitierenden Faktoren für das Wachstum der Mikroorganismen in der subgingivalen Plaque darstellen. Durch Kolonisation der gingivalen Tasche mit gram-negativen, fakultativ oder obligat anaeroben motilen Stäbchen und Spirochäten ändert sich die Zusammensetzung der subgingivalen Plaque.

Diese Kolonisation ist als Sekundärinfektion aufzufassen, da dieser Schritt nicht ohne die vorangegangenen erfolgen kann. Je nach Art, Zeitpunkt und Lokalisation dieser Sekundärinfektion resultiert eine andere Form der Parodontitis (Schroeder 1997).

Das Gingivaepithel stellt an sich eine effektive Barriere gegen bakterielle Produkte dar. Durch die Reaktion der Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte mit dem gingivalen Epithel kommt es jedoch zu einer Penetration der Bakterien in die darunter liegende subgingivale Bindegewebszone.

Das infiltrierte Bindegewebe ist kollagenarm, aber reich an Proteoglykanen (Bartold 1992).

Schließlich kommt es nach vermehrter Plaqueakkumulation zum Austritt von Exsudat. Dieses Exsudat enthält Sulkusflüssigkeit (Page & Schroeder 1976), welche aus dem Blutplasma resultiert und erste Komponenten der Wirtsabwehr enthält. Dazu zählen Lysozyme, Bradykinin, Thrombin, Fibrinogen, das Komplementsystem und Antikörper, die sowohl systemisch als auch lokal in der Taschenwand gebildet werden und spezifisch für die Antigene der Plaquebakterien sind (Cimasoni 1983).

Diese lokale, im gingivalen Gewebe stattfindende Antikörpersynthese variiert von Tasche zu Tasche innerhalb eines Individuums (Ebersole et al. 1984; Ebersole et al. 1994; Lovelace et al. 1982).

Aus zahlreichen hochendothelialen Venolen emigrieren ständig neutrophile Granulozyten, die dann im Exsudat erscheinen und zahlreiche Vakuolen enthalten, die Bakterien, Immunglobuline und Komplementkomponenten (C_3) in Form von Immunkomplexen einschließen (Saito et al. 1987).

Die neutrophilen Granulozyten sind verantwortlich für die Bildung eines Leukozytenwalls an der Oberfläche zwischen dem Sulkusepithel und der adhärenen Plaquezone. Dies stellt die erste Abwehr gegen den bakteriellen Übergriff dar.

Bis zu diesem Punkt handelt es sich noch um eine Gingivitis, eine oberflächliche Entzündung, die noch keine Gewebedestruktion und Knochenabbau verursacht und jederzeit reversibel ist.

Solange die neutrophilen Granulozyten diese oberflächliche Entzündung im Griff haben und sie erfolgreich kontrollieren, kann sie nicht tiefer ins Gewebe penetrieren (Salvi et al. 1997). In diesem Stadium liegt auch nur ein sehr spärliches Lymphozyteninfiltrat vor, das hauptsächlich aus T-Zellen, sehr wenigen B-Zellen und antikörperproduzierenden Plasmazellen besteht.

Man weiß heute von der Existenz von über 300 verschiedenen Bakterienspezies in der Mundhöhle (Moore & Moore 1994). Diese siedeln sich in dem Umfeld an, das von der Zahnoberfläche und den umgebenden Bedingungen der Mundhöhle und des Gingivaepithels bestimmt wird (Darveau et al. 1997).

Von den über 300 verschiedenen Bakterienspezies sind für die Entstehung und das Fortschreiten einer Parodontitis jedoch nur eine geringe Anzahl, überwiegend gram-negative anaerobe Bakterien, verantwortlich.

Bei Parodontitispatienten finden sich anteilig an der Gesamtflora weit über 50% gram-negative Bakterienspezies, dagegen nur ca. 15% bei parodontal gesunden Personen. Neben der Art der Bakterienspezies variiert auch die Bakterienmenge erheblich zwischen parodontal gesunden (10^2 bis 10^3) und kranken Individuen (10^5 bis 10^8) (Darveau et al. 1997).

Wolff et al. (1994) bringt mit parodontalen Erkrankungen hauptsächlich *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Fusobakterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Camphylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Bacteroides forsythus*, *Spirochäten* und *Treponema spp.* in Verbindung.

Auch auf dem „World Workshop on Clinical Periodontics 1996“ kam man zu der Erkenntnis, dass die meisten Parodontitiden durch die gram-negativen Anaerobier P.g., A.a. und *Bacteroides forsythus* in der subgingivalen Plaque ausgelöst werden (ANON 1996).

Sie sind an der Zusammensetzung der subgingivalen Plaque in aktiven Taschen zu einem höheren Prozentsatz beteiligt als in nicht-aktiven Taschen, wohingegen andere Bakterien wie *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* und *Actinomyces spp.* mit inaktiven Taschen assoziiert werden und ihnen eine möglicherweise protektive Wirkung zugesprochen wird (Socransky et al. 1988).

Insbesondere für die parodontalen Pathogene A.a. und P.g. sind schon eine Reihe von Pathogenitätsfaktoren beschrieben worden.

Die Kolonisation des Sulkusepithels durch A.a. wird unter anderem dadurch begünstigt, dass bestimmte Bakteriozine andere Bakterien der Parodontalflora wie *Streptococcus sanguis* und *Actinomyces viscosus* eliminieren (Hammond et al. 1987).

Die Adhäsion von A.a. am Sulkusepithel wird durch Fimbrien vermittelt (Rosan et al. 1988). Gleichzeitig wird die Immunantwort des Wirtes durch Leukotoxin, Fc-bindende Proteine und Chemotaxisinhibitor inhibiert. Bestimmte Stämme von A.a. produzieren ein Leukotoxin, das neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten abtötet (Zambon et al. 1983; Zambon 1985). Durch Bindung der Fc-bindenden Proteine an das Fc-Fragment der Immunglobuline wird die Opsonierung gehemmt (Mintz & Fives-Taylor 1994) und durch die Chemotaxisinhibitor wird die Rekrutierung der Leukozyten im Entzündungsbereich verhindert (Van Dyke et al. 1982). Von A.a. werden des weiteren Zytotoxine und Kollagenase gebildet, die das Eindringen dieser Spezies im Sulkusbereich vermitteln. Durch die Zytotoxine werden die Epithelzellen des

Saumepithels und die Fibroblasten zerstört (Helgeland & Nordby 1993), durch die Kollagenase das Kollagen der extrazellulären Matrix des Bindegewebes gespalten (Page et al. 1973). Außerdem ist A.a. in der Lage, die gingivalen Epithelzellen zur aktiven Aufnahme der Bakterien zu veranlassen, was schließlich die Zerstörung der befallenen Zellen zur Folge hat (Christersson et al. 1987; Saglie et al. 1986).

A.a. wird häufig mit der lokalisierten juvenilen Parodontitis in Verbindung gebracht. Es wird berichtet, dass dieser Keim zu 90% in Läsionen bei Erkrankten nachgewiesen werden kann (Tonetti & Mombelli 1999).

Misserfolge oder ständig auftretende Rezidive nach einer systematischen Parodontaltherapie können durch die nicht ausreichende Beseitigung von A.a. hervorgerufen werden.

Noch virulentere Eigenschaften als A.a. scheint *Porphyromonas gingivalis* zu besitzen.

P.g. bindet ebenso wie A.a. mittels Fimbrien an die Sulkusepithelzellen (Lee et al. 1991; Sojar et al. 1991).

Die Kapsel des Keimes vermag die Phagozytose im Sulkusbereich durch Makrophagen zu hemmen (Sundqvist et al. 1991; van Winkelhoff et al. 1993).

Ebenso ist dieser Keim nicht in der Lage, die Endothelzellen direkt zur Produktion von E-Selektin zu stimulieren (Darveau et al. 1997), was zur Folge hat, dass sich Leukozyten nicht an Endothelzellen binden können und damit nicht in den extravaskulären Raum auswandern können. Damit wird ein Schlüsselschritt in der Entwicklung der normalen Wirtsabwehr gelähmt.

Verschiedene sezernierte Enzyme von P.g. vermitteln durch hydrolytische, proteolytische und lipolytische Wirkung die Zerstörung des Parodontalgewebes (Grenier & Michaud 1993; Holt & Bramanti 1991; Kuramitsu et al. 1995; Yamamoto et al. 1996) und werden nach ihren katalytischen Eigenschaften in Serin-, Aspartat-, Thiol- und Metallo-Proteinasen eingeteilt (Holt et al. 1999).

Diese Enzyme besitzen die Möglichkeit, die Komplementfaktoren C₃ und C₅ sowie die Immunglobuline IgG und IgM zu inaktivieren (DiScipio et al. 1996; Grenier 1992; Travis et al. 1997).

Einige Stämme von P.g. können die Fc-Region von IgG abspalten, wodurch die Phagozytose und das Abtöten von Bakterien verhindert wird (Schenkein 1988).

Außerdem werden von P.g. Kollagenasen produziert, die die Kollagentypen I und IV abbauen (Holt & Bramanti 1991).

Ist eine Besiedelung mit P.g. vorhanden, so ergibt sich laut Socransky & Haffajee (1992) ein 2 bis 3-fach erhöhtes Risiko für einen Attachmentverlust.

Solche Eigenschaften, wie sie für A.a. und P.g. beschrieben sind, machen in ihrer Vielfalt und Summe diese oder andere Bakterien hochgradig virulent und pathogen (Haffajee & Socransky 1994) und liefern erste Erklärungen, warum die subgingivale mikrobielle Plaque so widerstandsfähig gegenüber der Wirtsabwehr ist.

Kommt es zur Überwindung der von den neutrophilen Granulozyten gebildeten ersten Abwehrlinie, dringen die Bakterien und deren Stoffwechselprodukte tiefer ins Gewebe ein. Dies markiert den Übergang von der Gingivitis zur Parodontitis, der biochemisch durch die Bildung von Produkten, die nach Makrophagen- und Lymphozytenaktivierung frei werden, beobachtet werden kann. Nun werden als zweite Defensivlinie die Monozyten bzw. Makrophagen aktiv (Offenbacher 1996).

Die ständige Freisetzung von gram-negativen Zellwandbestandteilen in die Mundhöhle verursacht eine unspezifische Reaktion der Immunabwehr.

Nach Bindung der Lipopolysaccharide (LPS) an lipopolysaccharidbindende Proteine (LBP) entsteht ein Komplex, der vom CD14-Rezeptor, der von Makrophagen exprimiert wird, erkannt wird. Durch diese Stimulation sezernieren Makrophagen das Prostaglandin E₂ (PgE₂) und die proinflammatorischen Zytokine IL1- β und TNF- α , die die parodontale Knochenresorption vermitteln, sowie Matrixmetalloproteinasen (MMP), die an der Destruktion der extrazellulären Matrix beteiligt sind (Gemmell et al. 1997; Page et al. 1997).

Das Interleukin-1, das in einer IL1- α -Form und einer IL1- β -Form existiert, stimuliert Adhäsionsmoleküle auf Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen. Über diese Adhäsionsmoleküle wird ein Angriff auf, sowie ein Eindringen durch das Gefäßendothel möglich, und es kann zur Chemotaxis an den Entzündungsstellen kommen.

Durch die oben genannten Mechanismen werden, wie schon erwähnt, auch die Endothelzellen aktiviert, was in einer Entzündung der Gefäßwände, Stase sowie klinisch sichtbarer Rötung und Schwellung der Gingiva resultiert.

Diese proinflammatorischen Zytokine induzieren die Freisetzung von PgE₂ sowie von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) durch die gingivalen Fibroblasten.

Die Folge ist eine Förderung der Alveolarknochenresorption und Destruktion der extrazellulären Matrix im Sulkusbereich (Page et al. 1997) (s. Abbildung 1).

Desweiteren beeinflussen sie ihrerseits wiederum sekundäre Entzündungsmediatoren wie den „platelet activated factor“ (PAF) sowie biogene Amine (Bradykinin, Histamin) (Offenbacher 1996) und fördern durch endotheliale Expression von E-Selektin die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen (Darveau et al. 1995).

Die Fibroblasten innerhalb des Entzündungsinfiltrats im Sulkusepithel weisen eine deutlich unterdrückte und verlangsamte Synthese von Typ-I-Kollagen auf, während in der bindegewebigen Umgebung des Infiltrats die Fibroblasten Typ-I-Kollagen in gesteigertem Maße produzieren (Larjava et al. 1989).

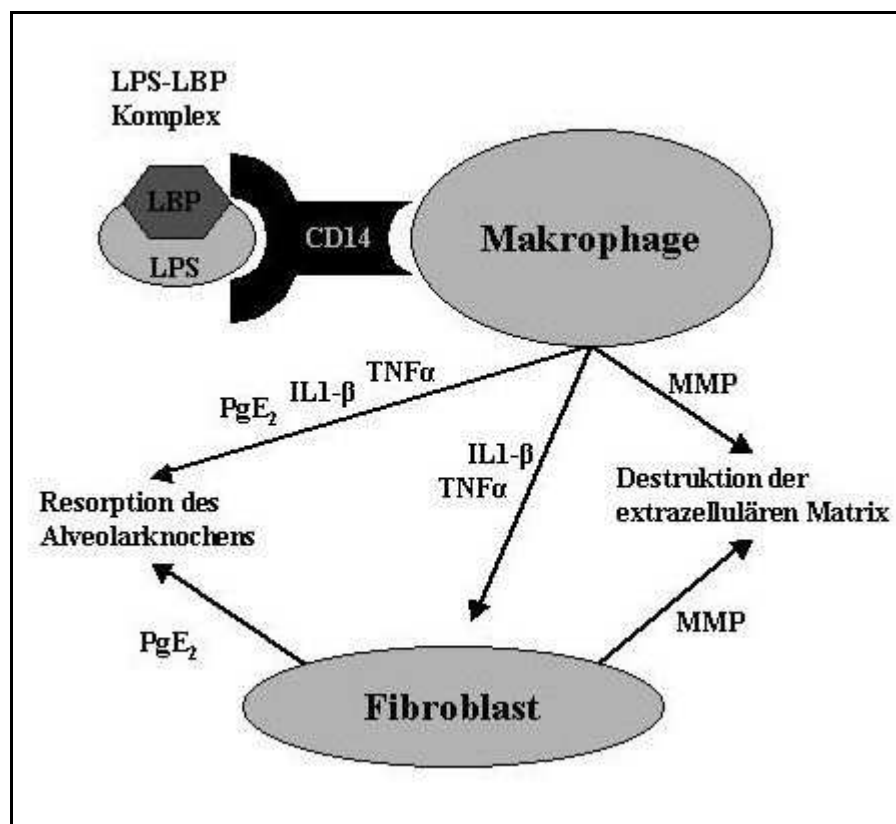


Abbildung 1: Einige zelluläre Mechanismen der Pathogenese der Parodontitis

Nach Bindung von LPS an LBP entsteht ein Komplex, der vom CD14-Rezeptor der Makrophagen erkannt wird. Die Makrophagen werden dadurch zur Sekretion von PgE_2 , den proinflammatorischen Zytokinen $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ sowie MMP stimuliert. Die Zytokine $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ induzieren die Freisetzung von PgE_2 und MMP der gingivalen Fibroblasten. Die Folge ist eine Förderung der Resorption des Alveolarknochens und der Destruktion der extrazellulären Matrix im Sulkusbereich (nach Page et al. 1997).

IL1- β sowie PgE₂ wirken beide negativ auf die Kollagensynthese ein (Alvares et al. 1995; Arai et al. 1995).

PgE₂ ist nach Offenbacher (1996) für Vasodilatation, Knochenabbau und Ödembildung als Stimulator und Auslöser anzusehen.

Bei AP-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Bildung an PgE₂ durch Monozyten gegenüber parodontal gesunden Individuen deutlich erhöht ist (Shapira et al. 1994). Werden Monozyten durch Lipopolysaccharid stimuliert, kommt es zur Bildung einer 3 bis 8-fach erhöhten Menge an PgE₂.

Durch die Lipopolysaccharide wird der alternative Weg der Komplementkaskade aktiviert (Kornman et al. 1997b), welcher wiederum Leukozyten aktiviert und die Opsonierung von Bakterien fördert (Dennison & Van Dyke 1997).

Die Lipopolysaccharide können systemisch sogar Schock, Fieber und intravaskuläre Koagulation verursachen (Offenbacher 1996).

Neben der Anwesenheit und Funktion der Fibroblasten, der neutrophilen Granulozyten und der Makrophagen in der Sulkusflüssigkeit bzw. im Infiltrat finden sich dort auch verschiedene Lymphozyten und sehr viele Plasmazellen (Schroeder 1997).

Unter den Lymphozyten befinden sich T-Zellen sowie B-Zellen in unterschiedlichen Anteilen (Reinhardt et al. 1988).

T-Zellen sind für die zellvermittelte Immunität verantwortlich und werden entsprechend ihrer Funktion in T-Helferzellen, T-Suppressorzellen und T-Killerzellen unterschieden. B-Zellen sind für die humorale Immunität verantwortlich und entwickeln sich zu antikörperbildenden Plasmazellen (Kornman et al. 1997b; Offenbacher 1996).

Die meisten Plasmazellen bilden Immunglobuline vom Typ IgG (ca. 60-80%), bedeutend weniger IgA (ca. 10-40%) und nur sehr wenige IgM (Kilian et al. 1989).

Nur ein Teil der Plasmazellen im Infiltrat bildet plaquespezifische Antikörper (Lovelace et al. 1982).

Die lokal stattfindende Antikörpersynthese liefert nach Menge und Spezifität unterschiedliche Antikörper, die mitunter einen größeren Anteil an der Gesamtmenge der lokal auftretenden Antikörper ausmachen können als die systemisch produzierten Antikörper (Ebersole et al. 1984; Ebersole et al. 1994; Lovelace et al. 1982).

Durch das Zusammenkommen von Mitogenen, Antigenen und Antikörpern im Sulkusepithel werden Immunkomplexe gebildet, die hauptsächlich in der Nähe von

Gefäßwänden auftreten. Dadurch kann es zur Auslösung einer allergischen Vaskulitis kommen (Nikolopoulou-Papaconstantinou et al. 1987).

Anhand des Antikörpertiters im Blut bzw. in der Sulkusflüssigkeit lässt sich die Schwere der Erkrankung gut erkennen. Der Antikörpertiter stellt dafür sogar ein besseres Maß dar als die Bakterienquantität (Wheeler et al. 1994).

Nach Ebersole (1990) sind die Antikörper in der Lage, die von pathogenen Keimen produzierten Stoffe wie Proteasen und Leukotoxine zu neutralisieren, aber nicht unbedingt die Keime selbst zu zerstören.

Kommt es zu einer ausreichend starken Antikörperreaktion, können die Auswirkungen der Erkrankung eingedämmt und die entstehende Läsion in ihrer Ausdehnung begrenzt werden (Salvi et al. 1997).

Außer der im vorangegangenen beschriebenen Abläufe und Faktoren nehmen auch noch andere modifizierende Faktoren, die erworben oder angeboren sein können, auf die Pathogenese der Parodontitis Einfluss. Daraus resultieren unterschiedliche klinische Schweregrade und individuelle Krankheitsverläufe.

Diese modifizierenden Faktoren werden als Risikofaktoren bezeichnet.

Norderyd (1998) definiert in seiner Arbeit einen Risikofaktor als einen Faktor, durch dessen Vorhandensein die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Krankheit direkt erhöht wird, wohingegen die Abwesenheit eines solchen Faktors diese verringert.

Als parodontale Risikofaktoren gelten Rauchen, Stress, einige systemische Erkrankungen wie Diabetes, Osteoporose und HIV sowie genetische Variationen.

Bei Rauchern geht man heute von einem 2,5- bis 6-fach höheren Risiko aus, an Parodontitis zu erkranken (American Academy of Periodontology AAP 1999).

Liegt eine genetisch bedingte Anfälligkeit für früh beginnende Parodontalerkrankungen wie der AP vor, so wirkt sich das Rauchen besonders ungünstig aus (Haber et al. 1993; Linden & Mullally 1994). Dies hängt mit einer stark unterdrückten Produktion spezifischer Antikörper gegen gram-negative pathogene Keime zusammen (Quinn et al. 1996; Tangada et al. 1997), wodurch es wiederum zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion mit erhöhter Freisetzung von IL1- β , TNF α und PgE $_2$ und den damit verbundenen Konsequenzen kommt (Offenbacher 1996; Payne et al. 1996).

Durch eine systematische Parodontalbehandlung kommt es zwar auch bei Rauchern zu einer Reduzierung der Taschentiefe und Attachmentgewinnen, jedoch sind diese aber bedeutend geringer als bei Nichtrauchern (Bostrom et al. 1998; Grossi et al. 1996).

McGuire & Nunn (1999) stellten fest, dass Raucher, die sich einer systematischen Parodontalbehandlung unterzogen haben und sich regelmäßig im Recall befinden in dieser Zeit mehr Zähne verlieren als Nichtraucher.

Bei Patienten, die das Rauchen aufgegeben hatten, zeigte sich eine deutliche Verzögerung der Progression des Knochenabbaus, was darauf schließen lässt, dass die negativen Effekte des Tabakkonsums reversibel zu sein scheinen (Bolin et al. 1993).

Auch psychosoziale Stresszustände scheinen einen Einfluss auf die Entstehung und die Progression der Parodontitis zu haben. In mehreren Querschnittsstudien konnten deutliche Zusammenhänge aufgezeigt werden (Breivik et al. 1996; da Silva et al. 1995; Genco et al. 1999).

Substanzen des Nervensystems und des neuroendokrinen Systems beeinflussen bei Stresszuständen die Immunaktivität und haben damit Einfluss auf die Entstehung einer Erkrankung (Sheridan et al. 1994).

Durch Stress kommt es zu einer erhöhten Entzündungsreaktion (Offenbacher 1996).

CRF (Corticotropin-Releasing-Factor) und Argininvasopressin werden im Rahmen einer Stressantwort ausgeschüttet, was wiederum zur Ausschüttung von ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) und schließlich zur Ausschüttung von Glucocorticoiden führt. Glucocorticoide hemmen die Immunantwort und führen zu einer reduzierten Lymphozytenzahl im Blut und einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten (Spencer 1994).

Auch bei Patienten, die an systemischen Erkrankungen leiden, werden häufig parodontale Erkrankungen festgestellt. Besonders der Diabetes mellitus, die Osteoporose und HIV scheinen mit der Parodontitis assoziiert zu sein (Emrich et al. 1991; Glavind et al. 1968; Murray 1994; Taguchi et al. 1995).

Kontrollierte Querschnitts- und Longitudinalstudien zeigten erhöhte Sondierungstiefen, Attachment- und Knochenverluste bei Diabetikern im Vergleich mit Gesunden (Firatli 1997; Thorstensson & Hugoson 1993).

Durch Studien bei Pima-Indianern, die eine sehr hohe Prävalenz von Typ2-Diabetes aufweisen, konnte gezeigt werden, dass der Typ2-Diabetes als Risikofaktor für die Parodontitis anzusehen ist (Emrich et al. 1991; Nelson et al. 1990).

Diabetiker weisen im Vergleich zu Nichtdiabetikern ein 2,8-fach erhöhtes Risiko für einen Attachmentverlust und ein 3,4-fach erhöhtes Risiko für einen Knochenverlust auf (Emrich et al. 1991). Auch die Inzidenz für die Entstehung einer Parodontitis ist bei Diabetikern um das 2,6-fache erhöht (Nelson et al. 1990).

Bei der Osteoporose handelt es sich im Gegensatz zur Parodontitis um eine systemische Erkrankung. Beide Erkrankungen sind aber durch Knochenverlust gekennzeichnet.

Salvi et al. (1997) vermuten, dass auch die parodontale Destruktion im Rahmen einer Parodontitis durch systemischen Knochenabbau beeinflusst wird. In mehreren Studien wurde der Zusammenhang zwischen skeletaler und mandibulärer Knochenmineraldichte analysiert. Dabei konnten einige Gemeinsamkeiten entdeckt werden (Kribbs et al. 1983; 1989; 1990; 1990).

Zwischen einer Osteoporose und vermehrtem Zahnverlust besteht eine enge Verbindung. Besonders bei Frauen mit Osteoporose konnte ein wesentlich höherer Zahnverlust als bei gesunden Frauen festgestellt werden (Krall et al. 1996; Taguchi et al. 1995).

Eine erhöhte Prävalenz zur Manifestation parodontaler Erkrankungen bei HIV-infizierten Patienten gegenüber nichtinfizierten Personen konnten Rego & Pinheiro (1998) in einer Studie zeigen.

HIV-positive Patienten und an AIDS-Erkrankte zeigen häufig akute nekrotisierende und ulzerierende Parodontitiden, die mit einer Zerstörung des gingivalen Gewebes, des Desmodonts und des Alveolarknochens einhergehen. Diese extrem schmerzhaften Parodontitiden sind mit einer Immunsuppression, die durch eine CD4-Lymphozytenanzahl von weniger als 200 Zellen/m³ gekennzeichnet ist, verbunden (Murray 1994).

Besonders in den letzten Jahren hat das Interesse an der Suche nach genetischen Risikofaktoren für die Parodontitis stark zugenommen. Die meisten genetischen Erkenntnisse, die man heute hat, beruhen auf Ergebnissen aus Familienstudien und molekulargenetischen Assoziationsstudien.

Ein Auslöser für solche Studien war die Arbeit von Loe et al. (1986). Sie konnten während eines Zeitraums von 15 Jahren bei Teeplantagenarbeitern auf Sri Lanka, die

keine Mundhygiene betrieben, drei Gruppen mit unterschiedlicher Progression der Parodontitis feststellen. Davon zeigten 8% bzw. 81% der Population eine rapide bzw. moderate Progression der Parodontitis, 11% jedoch keinerlei Progression. Diese Unterschiede ließen sich nicht anders als durch genetische Besonderheiten erklären.

Auch innerhalb einzelner Rassen sind die Häufigkeiten des Auftretens parodontaler Erkrankungen sehr unterschiedlich. Albandar et al. (1997) fanden bei einer Untersuchung in den USA bei 14000 Jugendlichen im Alter von 13 bis 17 Jahren heraus, dass frühbeginnende aggressive Formen der Parodontitis bei ca. 10% der Schwarzen, 5% der Hispanics, aber nur bei 1,3% der Weißen zu finden waren.

Ältere Studien haben keine signifikante Verbindung zwischen genetischen Faktoren und der Häufigkeit von Parodontitiden relativ zu anderen Umweltfaktoren gefunden (Chung et al. 1977).

Studien bei Zwillingen belegen aber, dass 38% bis 82% der Unterschiede in der Bevölkerung in Bezug auf das klinische Ausmaß der Erkrankung genetischen Faktoren zuzuschreiben sind (Michalowicz et al. 1991).

Verschiedene Erkrankungen, die von parodontalen Manifestationen begleitet werden, haben eine signifikante genetische Komponente. Die familiäre Häufung beim Papillon-Lefèvre-Syndrom wurde schon vor einigen Jahrzehnten beschrieben (Coccia et al. 1966). Genaue Daten über die Rolle genetischer Faktoren bei der Pathogenese dieser Erkrankung und ihrer parodontalen Komponenten wurden erst durch Zhang et al. (2001) beschrieben.

Aggressive aber auch andere Parodontitisformen werden bei dieser Erkrankung gehäuft angetroffen (Hart & Kornman 1997).

Frühe aggressive Parodontitiden sind mit dem LAD-Syndrom (leukocyte adhesion deficiency syndrome) (Waldrop et al. 1987) und anderen Leukozytendefekten, wie der Neutrozytopenie oder dem Chediak-Higashi-Syndrom, assoziiert (Altman et al. 1985).

Familiäre Häufungen wurden sowohl für die AP als auch für die CP beschrieben (Boughman et al. 1992; Hassell & Harris 1995; Jorgenson et al. 1975; Melnick et al. 1976). Besonders für die AP ergaben sich hierbei unproportional hohe Prävalenzraten, was den Einfluss eines genetischen Faktors untermauert (Tonetti & Mombelli 1999).

Melnick et al. (1976) vermuten einen x-chromosomal dominanten Erbgang für die AP, Long et al. (1987) sprechen von einem autosomal rezessiven und Marazita et al. (1994) von einem autosomal dominanten Erbgang.

Für die lokalisierte juvenile Parodontitis soll es sogar ein auf Chromosom 4q liegendes spezielles Gen geben (Boughman et al. 1986).

Hart & Kornman (1997) zeigten in ihrer Studie, dass bei der Entstehung parodontaler Erkrankungen die spezifischen Bakterien lediglich 20% aller hierzu notwendigen Faktoren darstellen. Diese Bakterien sind zwar essentiell für die Entstehung und Progression der Erkrankung, jedoch scheinen genetische Faktoren den Schweregrad der resultierenden Erkrankung zu beeinflussen.

So konnten bestimmte genetische Polymorphismen in bestimmten Gruppen von Parodontitispatienten in größerem Umfang gefunden werden.

Kornman et al. (1997a) fanden einen spezifischen Genotyp der polymorphen IL-1 Genregion auf Chromosom 2q13. Dieser Genotyp trat bei Nichtrauchern mit einer fortgeschrittenen Parodontitis (67%) signifikant häufiger auf als bei Nichtrauchern mit einer milden oder keiner Parodontitis (22%). Sie sind der Meinung, dass 86% der schweren Parodontalerkrankungen entweder auf den Tabakkonsum oder den IL-1 Genotyp zurückgeführt werden können und gehen davon aus, dass 30% der kaukasischen Bevölkerung IL-1 Genotyp positiv sind. McGuire & Nunn (1999) gehen von 38% aus, wobei ein positiver Genotyp das Risiko für Zahnverlust um das 2,7-fache erhöht.

Parkhill et al. (2000) fanden heraus, dass Personen, die positiv auf den IL-1 Genotyp getestet wurden, eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung einer AP aufweisen als Personen, die negativ für den IL-1 Genotyp sind.

Der IL1- β -Polymorphismus scheint als Risikofaktor für die Parodontitis wichtiger zu sein als der IL1- α -Polymorphismus (Diehl et al. 1999).

Eine Assoziationsstudie zwischen verschiedenen IL-1-Polymorphismen und generalisierter AP bei Europäern konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen AP-Patienten und der Kontrollgruppe zeigen (Hodge et al. 2001).

Bei verschiedenen TNF- α -Polymorphismen konnte kein Zusammenhang zwischen chronischer bzw. aggressiver Parodontitis und dem entsprechenden Genotyp gefunden werden (Endo et al. 2001; Galbraith et al. 1998; Shapira et al. 2001).

Shapira et al. (1994) konnten einen Zusammenhang zwischen der humanen Leukozyten-Antigen-Region (HLA-Region) HLA A9 und HLA B15 mit der generalisierten Form der AP nachweisen.

Bei einem Polymorphismus des Vitamin-D-Rezeptors besteht eine signifikante Beziehung zwischen der Genotypenverteilung und dem Auftreten einer lokalisierten aggressiven Parodontitis, jedoch nicht mit der generalisierten AP (Hennig et al. 1999).

In einer Gruppe von AP-Patienten wurde von Michel et al. (2001) ein größeres Auftreten des IL4-Polymorphismus als in einer Kontrollgruppe nachgewiesen.

Hierbei waren Patienten mit einer AP zu ca. 28% positiv für einen Polymorphismus im IL4-promoter (PP+) und des IL4-introns (IP+), wohingegen weder die Probanden der Kontrollgruppe noch die CP-Patienten diesen Polymorphismus aufwiesen.

Gwinn et al. (1999) berichten über eine enge Verbindung zwischen der lokalisierten aggressiven Parodontitis und einem Polymorphismus des fMLP-Rezeptors. Eine reduzierte fMLP-Rezeptor-Dichte und andere Defekte in den neutrophilen Granulozyten könnten für die erniedrigte Chemotaxis dieser Zellen verantwortlich sein (Kinane et al. 2001).

Bei einer Studie mit einer Gruppe Japanern fortgeschrittenen Alters wurde festgestellt, dass der Fc γ RIIIb-Polymorphismus bei Personen mit geringem Attachmentverlust und einer sehr guten Verankerung der Zähne im Parodontium überrepräsentiert war. Daraus wurde geschlossen, dass dieser Genotyp mit einer Resistenz gegen Parodontitis in Verbindung zu bringen sein könnte (Sugita et al. 2001).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Bakterien bzw. die bakterielle Plaque Parodontopathien verursachen und damit für den Ausbruch der Erkrankung verantwortlich sind. Sie sind aber nicht in der Lage, die Erkrankung alleine auszulösen. Modifizierende Faktoren, die genetische Anfälligkeit und andere Risikofaktoren spielen ebenso eine große Rolle und ohne ihr Vorhandensein käme es nicht zum Ausbruch der Erkrankung.

2.4. Der Fc γ RIIa-Polymorphismus

2.4.1. Der Fc γ -Rezeptor

Von dieser Rezeptorfamilie wird eine Vielzahl zelltyp-spezifischer Funktionen vermittelt wie Phagozytose, antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), Bildung von Peroxiden, Ausschüttung von Zytokinen, Zelldegranulation und Regulierung der Antikörperausschüttung (van der Pol & van de Winkel 1998).

Die Fc γ -Rezeptoren (Fc γ R) binden an die Fc-Region des Immunglobulins G und sind somit Rezeptoren für IgG (van der Pol & van de Winkel 1998).

Dieser Rezeptortyp existiert in drei Hauptklassen (Fc γ RI(CD36), Fc γ RII(CD32) und Fc γ RIII(CD16)), deren Gene auf dem langen Arm des Chromosoms 1 (1q21-24) lokalisiert sind (van de Winkel & Capel 1993; van der Pol & van de Winkel 1998).

Jede dieser drei Hauptklassen beinhaltet verschiedene Isoformen, die entsprechende Vorlieben bei der Bindungsaffinität an die unterschiedlichen IgG-Subklassen aufweisen (van de Winkel & Capel 1993).

Von den drei genannten Fc γ -Rezeptorklassen ist der Fc γ RII der am weitesten verbreitete Rezeptor und auf den meisten Arten von Leukozyten vorhanden (Flesch et al. 1998; Reilly et al. 1994; van de Winkel & Capel 1993).

Der Fc γ RII ist ein 40-kDa Glykoprotein mit geringer Affinität zu menschlichem IgG und wird durch 3 hoch homologe Gene kodiert: *Fc γ RIIA*, *Fc γ RIIB* und *Fc γ RIIC* (Flesch et al. 1998; Osborne et al. 1994; Warmerdam et al. 1990; Warmerdam et al. 1993).

Diese 3 Gene erzeugen 6 Transkripte (*Fc γ RIIA1* und 2; *Fc γ RIIB1*, 2 und 3; *Fc γ RIIC*), wobei *Fc γ RIIA2* die Information für eine Transmembran-Region fehlt (Tse et al. 1999; Warmerdam et al. 1993). Jedes Gen umspannt 15-19 Kilobasen an DNA und besteht aus 8 Exons (Warmerdam et al. 1993).

Fc γ RIIA ist das einzige dieser Gene, welches allele Variationen aufweist (Flesch et al. 1998) und kodiert den Fc γ RIIa-Rezeptor, eine Isoform, die sich auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten befindet (Wilson & Kalmar 1996).

Der Fc γ RIIa-Rezeptor ist auf dem chromosomalen Locus 1q23-24 des Chromosoms 1 lokalisiert (van der Pol & van de Winkel 1998; Warmerdam et al. 1993).

2.4.2. Polymorphismus von FcγRIIa

Unter einem Polymorphismus im Allgemeinen versteht man das gleichzeitige Vorkommen von unterschiedlichen Genotypen innerhalb einer Population. Jede Region innerhalb der DNA kann also genotypische Sequenzvariationen aufweisen. Einige der Polymorphismen erfolgen in kodierenden Sequenzen. Sie führen zu genetischer Variation oder Krankheitsstatus innerhalb der Population.

Die Existenz von einigen genetischen Polymorphismen mit Bedeutung für die Parodontitis wurde schon dokumentiert.

Polymorphismen in den Genen, die die Rezeptoren FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa und FcγRIIIb verschlüsseln, können Unterschiede in der Antikörperbindung und der Phagozytose und deshalb auch in der Anfälligkeit für die Parodontitis bedingen.

Das Gen von FcγRIIa weist, wie schon erwähnt, als einziges der drei *FcγRII*-Gene alle Variationen auf. Inzwischen konnte an mindestens 30 Stellen des *FcγRIIA*-Gens ein Polymorphismus beschrieben werden. Bei 6 dieser Polymorphismen werden unterschiedliche Aminosäuren im Protein eingebaut.

Einer dieser Polymorphismen ist an Codon-Position 27 vorhanden, wo durch einen Austausch von ACA → ATG Glutamin oder Tryptophan als Aminosäure entsteht (van der Pol & van de Winkel 1998; Warmerdam et al. 1990; Warmerdam et al. 1991). Für diesen Polymorphismus konnte jedoch kein Einfluss auf die Rezeptoraffinität für IgG gefunden werden, weshalb es sich bei diesem Polymorphismus um einen Polymorphismus ohne Funktion („non-function-polymorphism“) handelt (Warmerdam et al. 1990; Warmerdam et al. 1991).

Ein weiterer dieser Polymorphismen übt jedoch einen Effekt auf die Rezeptoraffinität und Spezifität aus (van der Pol & van de Winkel 1998). Dieser Polymorphismus (rs1801274) besteht aus einem einfachen Basenaustausch A→G.

Ist in Codon 131 der kodierenden Region des Exon 4, an Nukleotid 494, die Base Adenin (A) vorhanden, erhält man die Aminosäure Histidin (H) in der 2. extrazellulären Domäne des FcγRIIa-Moleküls. Befindet sich anstatt Adenin (A) Guanin (G) in Codon 131 erhält man Arginin (R) im FcγRIIa-Molekül (Flesch et al. 1998; Osborne et al. 1994; van der Pol & van de Winkel 1998; Warmerdam et al. 1990).

Daraus ergeben sich dann die zwei polymorphen Formen FcγRIIa-131R und FcγRIIa-131H. Diese zwei polymorphen Formen unterscheiden sich bezüglich ihrer Affinität zu humanem IgG₂ (hIgG₂) und IgG₁ bei Mäusen (mIgG₁), was zu einer unterschiedlichen Immunantwort gegen bakterielle Polysaccharide und eingekapselte Bakterien führt (Flesch et al. 1998; Osborne et al. 1994; Warmerdam et al. 1991).

In Studien ließ man Monozyten verschiedener Individuen mit mIgG₁ reagieren.

Diese Reaktion sollte eine T-Zell-Proliferation induzieren (Tax et al. 1984).

Bei 70% der Testpersonen konnte eine Proliferationsreaktion beobachtet werden, worauf man sie „*high responder*“ (HR) nannte. Die anderen 30%, die keine T-Zell-Proliferation hervorriefen, wurden „*low responder*“ (LR) genannt.

Später ließ sich beweisen, dass die „*high responder*“ den FcγRIIa-131R/131R bzw. FcγRIIa-131R/131H Genotyp besaßen, während die „*low responder*“ den FcγRIIa-131H/131H Genotyp aufwiesen.

2.4.3. FcγRIIa, IgG₂ und aggressive Parodontitis

IgG₂ ist eine Subklasse der Immunglobuline G, die von B-Zellen produziert werden und die dominierende Antikörperklasse im Plasma darstellen. Sie opsonieren antigentragende Zellen, so dass diese dann von phagozytierenden Zellen erkannt und eliminiert werden können.

Der Isotyp IgG₂ wird hauptsächlich bei verschiedenen bakteriellen Infektionen einschließlich Infektionen des Parodonts produziert und induziert die Immunantwort gegen bakterielle Antigene (Colombo et al. 1998).

Für die Bindung von IgG besitzt FcγRII drei Domänen, die zwischen den As 109-116, 129-135 und 154-161 lokalisiert sind (van der Pol & van de Winkel 1998).

FcγRIIa ist die einzige Rezeptorklasse, die komplexes humanes IgG₂ binden kann.

Die Bindungsstelle für IgG₂ befindet sich am Berührungspunkt der 1. und 2. extrazellulären Domäne des FcγRIIa.

Der FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) spielt eine wichtige Rolle in Bezug auf das Bindungsvermögen gegenüber IgG₂ und damit auch auf die Erkennung und Beseitigung von bestimmten bakteriellen Erregern.

Warmerdam et al. (1991) zeigten, dass nur der „*low responder*“-Allotyp humanes IgG₂ effizient bindet. Osborne et al. (1994) stellten fest, dass FcγRIIa-131H hIgG₂ mit einer

sehr hohen Affinität und mIgG₁ mit einer äußerst geringen Affinität bindet, wohingegen FcγRIIa-131R hIgG₂ kaum bzw. gar nicht bindet, aber der einzige Rezeptor ist, der mIgG₁ effizient bindet.

Außerdem binden Monozyten und Neutrophile, die den 131H-Rezeptor Allotyp besitzen, IgG₂-ummantelte Erythrozyten und Bakterien und nehmen sie auf. Neutrophile von FcγRIIa-131R homozygoten Personen phagozytieren IgG₂ opsonierte Partikel weit weniger effizient als Neutrophile von FcγRIIa-131H homozygoten Personen (van der Pol & van de Winkel 1998).

Hieraus wird ersichtlich, dass der durch den Polymorphismus verursachte Unterschied zwischen FcγRIIa-131R und FcγRIIa-131H funktionelle Bedeutung hat und bei bakteriellen Infektionen eine wichtige Rolle spielt, bei denen IgG₂ als hauptsächliche Antikörperklasse vorkommt.

Platonov et al. (1998) konnten nachweisen, dass Patienten mit dem FcγRIIa-131H Allotyp im Gegensatz zu denen mit dem FcγRIIa-131R Allotyp eine höhere erworbene antikörpervermittelte phagozytoseabhängige Widerstandskraft gegen Erkrankungen haben, die durch Meningokokken ausgelöst werden. Bei Patienten mit einer Infektion durch Meningokokken war der FcγRIIa-131R Allotyp überrepräsentiert.

Bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) werden Erkrankungen, die durch Pneumokokken ausgelöst werden, mit dem FcγRIIa-131H Allotyp in Verbindung gebracht (Yee et al. 1997).

Blasini et al. (1993) berichten über einen großen Anteil von Individuen innerhalb der SLE-Patienten, die den FcγRIIa-131R/131R Genotyp aufweisen.

Zwei weitere Erkrankungen, die mit dem Fcγ-Rezeptor in Verbindung gebracht werden, sind die Wegeners Granulomatose (WG) und die heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) (van der Pol & van de Winkel 1998).

Bei der WG handelt es sich um eine systemische Vaskulitis, die hauptsächlich die Atmungsorgane und die Nieren befällt und charakterisiert ist durch das Vorhandensein von „anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)“ (van der Pol & van de Winkel 1998). Eine Interaktion von FcγRIIa und ANCA kann zu einer Unterstützung oder sogar zur Auslösung von entzündlichen Prozessen der Gefäße führen (Porges et al. 1994). Laut Tse et al. (1999) ist der FcγRIIa jedoch kein Hauptfaktor für eine ANCA-positive systemische Vaskulitis oder eine Nephritis.

Bei der HIT handelt es sich um eine spezielle Form der Thrombozytopenie, die gelegentlich nach Behandlung mit Heparin auftritt (van der Pol & van de Winkel 1998). Arepally et al. (1997) konnten in einer Studie bei 388 Patienten zeigen, dass HIT und Thrombose mit FcγRIIa-131R in Verbindung stehen.

Die Häufigkeit der FcγRIIa-Genotypen und die Verteilung der beiden Allele ist nicht in allen ethnischen Gruppen gleich, sondern variiert hier erheblich. So weisen beispielsweise Ostasiaten (Japaner, Chinesen, Inder) häufiger den 131H-Allotyp auf als eine europäische Gruppe (Osborne et al. 1994).

Zambon (1985) fand in der subgingivalen Mikroflora von Patienten mit einer lokalisierten AP große Mengen von A.a, einem Schlüsselpathogen dieser Erkrankung.

A.a. ist aber nicht der alleinige Auslöser dieser Erkrankung, vielmehr ist es eine Kombination aus einer Infektion mit A.a. sowie spezifischen lokalen und systemischen Immunfaktoren (Slots & Rams 1991).

Schon vor vielen Jahren hat man bemerkt, dass in Seren von AP-Patienten oft erhöhte Titer von IgG-Antikörpern gegen A.a. zu finden sind (Ebersole et al. 1982), insbesondere von IgG₂, das die vorherrschende IgG-Subklasse bei der lokalisierten AP darstellt (Dibart et al. 1998; Tew et al. 1996).

Dieses IgG₂ ist verantwortlich für die Immunantwort gegen A.a., indem es dem serotypspezifischen Carbohydrat entgegenwirkt (Tew et al. 1996).

Wilson et al. (1995) beschrieben, dass humane Neutrophile von Spendern, die homozygot für den 131H-Allotyp sind, A.a. effektiv phagozytieren und abtöten.

IgG₂-Antikörper in Seren von Patienten mit einer lokalisierten AP unterstützen diesen Vorgang.

Durch eine Fluoreszenzuntersuchung konnte nachgewiesen werden, dass die Phagozytoserate von mit IgG₂ inkubierten A.a. bei Neutrophilen, die homozygot für das 131H-Allel des FcγRIIa sind, erheblich höher ist als bei Neutrophilen, die für das 131R-Allel homozygot sind (Kalmar 1994).

Wilson & Kalmar (1996) kamen zu dem Schluss, dass eine erhöhte Produktion an IgG₂ in Kombination mit dem FcγRIIa-131R Allotyp zur Anfälligkeit für eine AP beisteuert.

Untersuchungen großer Gruppen an AP-Patienten zeigen, dass das Ausmaß und die Heftigkeit der Erkrankung bei Patienten, die serumpositiv für A.a. sind, geringer ist als bei Patienten, die serumnegativ für A.a. sind (Tew et al. 1996).

Dieser Sachverhalt führten Tew et al. (1996) zu der Hypothese, dass anti-A.a. Antikörper gegen parodontale Erkrankungen, die hauptsächlich durch A.a. ausgelöst werden, schützen können.

Epidemiologische Studien zeigen, dass die Häufigkeit der AP bei Individuen negroider Abstammung höher ist als bei Weißen.

Interessanterweise weisen diese Individuen einen höheren Titer an Serum IgG₂ und eine höhere Frequenz an anti-A.a. Antikörpern im Serum auf als Weiße.

Der erhöhte Titer an Serum IgG₂ kann teilweise anti-A.a. zugeschrieben werden, jedoch scheinen diese Personen auch noch erhöhte Titer an IgG₂ gegen andere Antigene zu haben, was den insgesamt hohen Titer an Serum IgG erklärt (Tew et al. 1996).

2.4.4. Genetische Analyse des FcγRIIa-Polymorphismus mittels PCR

Osborne et al. (1994) untersuchten in ihrer Studie die Genotypen von 65 Personen aus verschiedenen ethnischen Gruppen (Japaner, Chinesen, Inder und Europäer), um die Verteilung der beiden allelen Formen des FcγRIIa (rs1801274) bei diesen Gruppen nachzuweisen. Sie benutzten dazu die Technik der PCR-Amplifizierung genomischer DNA und gebrauchten allelspezifische Oligonukleotidsonden zur Hybridisierung. Mit dieser Methode war es ihnen möglich, von einer großen Anzahl an Personen den Genotyp des FcγRIIa zu bestimmen. Viele Andere übernahmen diese Methode, um verschiedene Patientengruppen hinsichtlich des FcγRIIa-131H und 131R Allotyps zu unterscheiden (Colombo et al. 1998; Tse et al. 1999; Platonov et al. 1998).

Dazu wurden den Patienten Blutproben entnommen, die genomische DNA aus dem Gesamtblut isoliert und der FcγR-Genotyp bestimmt. Die Primer für die PCR-Amplifizierung eines Teils des *FcγRIIA*-Gens waren in allen Studien identisch. Es handelt sich um den

Sense-Primer: 5'-CAAGCCTCTGGTCAAGGTC-3' und den

Antisense-Primer: 5'-GAAGAGCTGCCCATGCTG-3'.

Die allelspezifischen Oligonukleotidsonden ASO-494 G (131R spezifisch) und ASO-494 A (131H spezifisch) unterscheiden sich um ein Nukleotid im Zentrum des 17-mer ASO, Sense: 5'-ATTCTCCC[G/A]TTTGGATC-3' (Osborne et al. 1994).

Reilly et al. (1994) beschreiben zwei Methoden zur Untersuchung des FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274). Zum einen eine PCR-basierte Analyse der

DNA-Sequenz, zum anderen eine single strand conformation polymorphism- (SSCP-) Untersuchung. Hierbei handelt es sich um eine besondere Art der Gelelektrophorese, mit der sich Polymorphismen nachweisen, aber nicht beschreiben lassen.

Die PCR-Amplifizierung der Region des Gens, welches den FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) umfasst, erfolgte mit Hilfe von Oligonukleotidprimern, die *FcγRIIA* von den hoch homologen Genen *FcγRIIB* und *FcγRIIC* unterscheiden.

Der Sense-Primer stammt aus dem Gebiet der 2. extrazellulären Domäne (5'-CTCTGGTCAAGGTCACATTC-3'). Der Antisense-Primer stammt aus einem Gebiet des Downstream-Introns, wo die Sequenzen für *FcγRIIA*, *FcγRIIB* und *FcγRIIC* voneinander abweichen (5'-CAATTTTGCTGCTATGGGC-3').

Dieses Intron enthält Sequenzen, welche den FcγRIIa- von den FcγRIIb- und FcγRIIc-Rezeptoren unterscheidet. Es befindet sich zwischen der extrazellulären Domäne D₂ (Exon 4) und dem Transmembran-Exon T_m (Reilly et al. 1994).

Das entstandene PCR-Produkt wurde dann einer automatisierten DNA-Sequenzanalyse und einer SSCP-Untersuchung zugeführt. Laut Reilly et al. (1994) ist die SSCP-Untersuchung eine zeitsparende und effiziente Alternative zur DNA-Sequenzanalyse.

Eine weitere Methode den FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) zu untersuchen stammt von Flesch et al. (1998). Sie entwickelten eine Methode, um durch PCR unter Benutzung von allelspezifischen Primern (ASPs) zwischen beiden Isoformen zu unterscheiden. Hierzu wurde ein 131H-spezifischer Senseprimer:

5'-ATCCCAGAAATTCTCCCA-3' sowie ein 131R-spezifischer Sense-Primer:

5'-ATCCCAGAAATTCTCCCG-3' verwendet.

Beim Antisense-Primer handelt es sich um denselben wie bei Reilly et al. (1994) (5'-CAATTTTGCTGCTATGGGC-3').

Bei der allelspezifischen PCR wird der Basenaustausch genutzt, um unterschiedliche Primer zu konstruieren, deren 3' Ende jeweils die definierende Base enthält. Weist die zu untersuchende DNA nicht die komplementäre Base auf, so kommt es zu keiner Elongation der Primer DNA. Die Ergebnisse der Genotypisierung wurden am Ende mit denen verglichen, die man mit der Methode nach Osborne et al. (1994) erhalten hatte und stimmten mit diesen überein (Flesch et al. 1998; Osborne et al. 1994).

Auch die Gegenüberstellung mit einer Immun-Phagozytose-Untersuchung (Schnackenberg et al. 1997) lieferte ebenfalls übereinstimmende Ergebnisse.

3. Ziele der Studie

Ziel dieser Studie war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen der aggressiven Parodontitis und dem FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) innerhalb einer mitteleuropäischen Population aufzuzeigen. Hierzu wurden zwei Testgruppen gebildet: eine parodontal gesunde Kontrollgruppe und eine Gruppe mit AP-Patienten. Die Verteilung der Häufigkeit des polymorphen Markers bei den beiden Testgruppen sollte dann Rückschlüsse zulassen, ob dieser Polymorphismus einen Einfluss auf die Pathogenese der AP haben könnte.

Um diese Untersuchungen reproduzierbar durchführen zu können, sollte ein schnelles und einfaches Nachweissystem angewandt werden.

Patienten mit einer AP und Probanden einer Kontrollgruppe mit gesundem Parodontium wurde Blut entnommen und daraus die DNA extrahiert.

In einer Reihe von Vorversuchen wurden verschiedene Polymerasen, Konzentrationsverhältnisse der PCR-Komponenten und PCR-Programme ausgetestet, um ein funktionsfähiges System aufbauen zu können.

Die mit diesem System gewonnenen Ergebnisse der beiden Gruppen sollten dann einander gegenübergestellt werden. Zusätzlich sollten die klinischen Parameter zwischen den Gruppen als Ausdruck des Zustands des gesunden Parodontiums und als messbare Faktoren der AP verglichen werden.

Loe et al. (1986) vermuteten schon lange einen genetischen Einfluss auf die Pathogenese der Parodontitis. Durch Studien mit Zwillingen konnte belegt werden, dass genetische Faktoren bei der Parodontitis eine nicht zu unterschätzende, pathogene Rolle spielen (Michalowicz et al. 1991; Michalowicz 1994).

Der FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) wird schon seit längerem mit anderen Erkrankungen, hauptsächlich bakteriellen Infektionen, in Verbindung gebracht.

In Bezug auf diesen FcγRIIa-Polymorphismus stellten Wilson & Kalmar (1996) die Hypothese auf, dass FcγRIIa-131R in Verbindung mit einer erhöhten IgG₂-Produktion zur Anfälligkeit für eine lokalisierte AP beisteuert (Wilson & Kalmar 1996).

Eine Studie von Kobayashi et al. (2000) hat keinen signifikanten Unterschied im Vorhandensein des FcγRIIa-131R Allotyps bei Patienten mit einer generalisierten AP und einer gesunden Kontrollgruppe innerhalb der japanischen Bevölkerung gezeigt.

Einige andere Polymorphismen hingegen wurden in diversen Untersuchungen schon eindeutig mit einzelnen Formen der Parodontitis in Verbindung gebracht.

So werden verschiedene Allotypen der „Major Histocompatibility Complex“ Region (HLA) werden mit der generalisierten Form der AP assoziiert. Shapira et al. (1994) konnten einen Zusammenhang zwischen HLA A9 und HLA B15 mit der generalisierten Form der AP nachweisen. Kornman et al. (1997a) zeigten, dass der IL1-Polymorphismus einen Einfluss auf die Anfälligkeit für eine chronische Parodontitis (CP) hat. Untersuchungen in der Abteilung für Parodontologie der Universität Giessen haben gezeigt, dass Patienten mit einer AP zu ca. 28% positiv für einen Polymorphismus im IL4-promoter (PP+) und des IL4-introns (IP+) waren, wohingegen kein Proband der Kontrollgruppe und kein Patient mit einer CP diesen Polymorphismus aufwies (Michel et al. 2001).

Als Ergebnis dieser Arbeit könnte im Rahmen der Untersuchung ein Zusammenhang zwischen dem FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) und der AP nachgewiesen werden, was unter Umständen zu weiteren Untersuchungen in dieser Richtung führen könnte.

4. Material und Methoden

4.1. Studienprotokoll

Im Vorfeld der Studie wurde ein schriftliches Studienprotokoll erstellt, in dem alle für die Studie relevanten Punkte erörtert wurden.

Dieses umfasste zum einen eine kurze Abhandlung über den wissenschaftlichen Hintergrund, dem eine umfassende Literaturrecherche vorausging. Zum anderen wurden die Ziele der Studie und das Studiendesign inklusive Studienpopulation und Eingangsuntersuchungen der Patienten und Probanden klar formuliert. Ein wichtiger Punkt war die genaue Festlegung der zu verwendenden Materialien, Methoden und Arbeitsabläufe im Labor, die hier schon in ihrer Grundform erläutert wurden und während der Tätigkeit im Labor durch diverse Vorversuche optimiert werden mussten. Als Orientierung galten international vergleichbare Untersuchungen.

4.2. Klinische und radiologische Untersuchungsmethoden

Die für die Studie in Frage kommenden Patienten und Probanden mussten anhand klinischer und radiologischer Untersuchungsmethoden im Vorfeld ermittelt werden.

Dabei kamen sowohl unterschiedliche klinische als auch radiologische Untersuchungsmethoden zum Einsatz, die im Folgenden näher erläutert werden.

- Sondierungstiefe (ST): Die Sondierungstiefe ist die Distanz vom Gingivarand bis zum Sulkusboden bzw. Boden der Zahnfleischtasche und wird in mm angegeben. Die Messungen wurden mit einer Parodontalsonde an allen Zähnen mittels der „walking through the sulcus“-Technik durchgeführt und die 6 tiefsten Stellen/Zahn (mesio-bukkal, bukkal, disto-bukkal, mesio-oral, oral, disto-oral) ermittelt.
- Sondierungsblutung (SB): Die Sondierungsblutung wurde kurze Zeit nach parodontaler Sondierung überprüft und wurde mit einer reinen Ja (+)- / Nein (-) -Entscheidung an den entsprechenden Stellen festgehalten. Sie ist ein objektives Symptom der parodontalen Entzündung.

- Klinischer Attachmentlevel (AL): Der klinische Attachmentlevel wurde bestimmt durch die Messung der Distanz zwischen Schmelz-Zement-Grenze und sondierbarem Sulkus- bzw. Taschenboden. Auch diese Messung wurde wie die ST mit einer Parodontalsonde an 6 Stellen/Zahn durchgeführt und in mm angegeben.
- Furkationsbefall (FK): FK Grad I bedeutete horizontaler Attachmentverlust <3 mm, FK-Grad II horizontaler Attachmentverlust >3 mm, aber nicht durchgängig, und FK-Grad III durchgängig sondierbar.
- Lockerungsgrad (LG): Der Lockerungsgrad wurde eingeteilt in 0 = physiologisch beweglich, I = fühlbar horizontal beweglich, II = sichtbar horizontal beweglich und III = Beweglichkeit auf Wangen- und Zungendruck sowie auch axial.
- Papillenblutungsindex (PBI): Hierbei wurde mit Hilfe einer Parodontalsonde durch Ausstreichen des Sulcus an jedem Zahn versucht, eine Blutung zu provozieren. Das Auftreten einer Blutung wurde mit einer Ja-Entscheidung dokumentiert. Sämtliche positiven Messungen wurden durch die Anzahl der Messstellen dividiert und als Prozentwert angegeben.
- Plaqueindex (PI): Nach Anfärben aller Zähne mit einem Plaquerevelator (Erythrosin + Patentblau V) wurde der Plaquebefall an allen 4 Zahnflächen/Zahn (vestibulär, oral, mesial, distal) erfasst und in ein Schema eingetragen. Der Plaquebefall wurde auch hier als Prozentwert angegeben, indem man die Summe der positiven Messungen durch die Anzahl der Messstellen dividierte.
- Radiologische Untersuchung: Zur Erhebung der radiologischen Befunde wurde ein Röntgenstatus aller Zähne mit Einzelzahnfilmen in Rechtwinkeltechnik erstellt, um eine nahezu maßstabsgetreue Darstellung der Zähne und der alveolären Strukturen zu erreichen. Alternativ dazu erfolgte die radiologische Beurteilung anhand von OPGs. Anhand der Röntgenbilder wurde kontrolliert, ob parodontal bedingte Knochendestruktionen, horizontaler und/oder vertikaler Knochenabbau mit infraalveolären Knochentaschen, erweiterte Desmodontalspalten, Konkrememente, apikale Osteolysen, überstehende Kronen- und Füllungsråder sowie Veränderungen der Zahnhartsubstanzen vorliegen. Es wurde das Knochenniveau bzw. der evtl. Alveolarknochenverlust gemessen.

4.3. Gruppeneinteilung

Die Teilnehmer dieser Untersuchung wurden in zwei Gruppen (Gruppe 0, Gruppe 1) eingeteilt. Gruppe 0 war die Kontrollgruppe und bestand aus parodontal gesunden Probanden, Gruppe 1 bestand aus Patienten, die nachweislich an einer AP erkrankt sind. Bei allen Personen wurde eine Eingangsuntersuchung durchgeführt. Diese Untersuchung erfolgte nach den in „Klinische und radiologische Untersuchungsmethoden“ (Kapitel 4.2) beschriebenen Methoden. Zur Dokumentation der Indizes und Befunde wurden die Befundbögen der Abteilung für Parodontologie der JLU Giessen, Leiter: Prof. Dr. J. Meyle, verwendet. Danach wurde Blut entnommen (siehe Kapitel 4.5) und bis zur weiteren experimentellen Untersuchung gelagert. Die Probenentnahme erfolgte nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten und Probanden.

Die Probanden und Patienten wurden dann nach bestimmten klinischen und radiologischen Kriterien ausgewählt (siehe 4.4) und den Gruppen zugewiesen.

Vor Beginn der Laboruntersuchungen wurde jedem Teilnehmer eine Identifikationsnummer (ID-Nr.) zugewiesen, die von den persönlichen und klinischen Daten getrennt aufbewahrt wurde, damit es möglich war, die Ergebnisse anonym auszuwerten.

4.4. Ein- und Ausschlusskriterien

Gruppe 0 = Probanden (Kontrollgruppe):

Für die Personen der Kontrollgruppe mussten folgende Voraussetzungen zur Teilnahme an der Studie erfüllt sein:

- Parodontal gesunde Probanden (Nachweis mittels klinischer und radiologischer Untersuchung s. 4.2)
- Gute Mundhygiene (Nachweis mittels PI und PBI)
- Physiologische Taschentiefen gemessen an 6 Stellen/Zahn
- Kein Attachmentverlust gemessen an 6 Stellen/Zahn
- Kein erkennbarer vertikaler oder horizontaler Knochenabbau
- Keine systemischen Erkrankungen
- Keine dauerhafte Medikation
- Keine Antibiose in den letzten 8 Wochen vor Probenentnahme
- Mitteleuropäische Abstammung
- Nichtraucher
- Saniertes Gebiss

Gruppe 1 = AP-Patienten

Die Personen der Gruppe 1 mussten folgende Kriterien erfüllen, um an der Studie teilnehmen zu können:

- Patienten mit AP
- Nachweis der AP mittels klinischer und radiologischer Untersuchung (s. 4.2)
- Sondierungstiefe >5 mm an mindestens einer Stelle gemessen an 6 Stellen/Zahn
- Attachmentverlust >6 mm an mindestens 1 Stelle gemessen an 6 Stellen/Zahn
- Sondierungsblutung/Pus an mindestens einer Stelle gemessen an 6 Stellen/Zahn
- Alveolarknochenverlust an mindestens 4 Stellen interproximal mit >6 mm bzw. $\geq 50\%$ Knochenverlust

- Mikrobiologischer Nachweis eines hohen Anteils an *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in der Plaque (fakultativ)
- Keine systemischen Erkrankungen
- Keine dauerhafte Medikation
- Keine Antibiose in den letzten 8 Wochen vor Probenentnahme
- Mitteleuropäische Abstammung
- Nichtraucher

Insgesamt wurden 46 parodontal gesunde Probanden und 50 an AP erkrankte Patienten in die Untersuchung einbezogen.

4.5. Entnahme und Weiterverarbeitung von Blut

Blut wurde aus der Armvene entnommen und zur Serum- und Plasmagewinnung, für die EDTA-Blutgewinnung und zur Bestimmung der Blutsenkungsgeschwindigkeit in spezielle, farblich markierte Röhrchen gegeben.

Die Einstunden- und Zweistundenwerte der Blutsenkungsgeschwindigkeit wurden an einer Skala abgelesen und zu Dokumentationszwecken notiert.

Die Röhrchen mit dem Blut für die Serum- und Plasmagewinnung wurden bei 3500 U/min. für 10 min. zentrifugiert. Danach wurden vom Überstand in den Röhrchen 10 Aliquots á 220 µl abpipettiert und auf Plastikreaktionsgefäße, sogenannte Caps (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) verteilt. Die so gewonnenen Proben wurden für weitere experimentelle Untersuchungen im Gefrierschrank bei –80 °C gelagert.

Vom EDTA-Blut wurden 15 µl abpipettiert, auf einen Objektträger gegeben und damit ein Ausstrich angefertigt, der zu Dokumentationszwecken aufbewahrt wurde.

Ein Großteil des EDTA-Blutes wurde ebenso wie das Plasma und das Serum zu je 220 µl auf Caps verteilt und im Gefrierschrank gelagert.

Je 20 µl EDTA-Blut auf jedes der 4 Dreiecke eines S&S Isocode® Stix (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) gegeben und im Luftabzug getrocknet.

4.6. Isolation der genomischen DNA

Die Isolation der genomischen DNA erfolgte mit Hilfe der Isocode® Stix (Vorgehen siehe 4.5). Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde nur mit Einmalhandschuhen, sowie mit sterilen und DNase-freien Pipettenspitzen und Caps gearbeitet. Beim Vorgehen hielt man sich strikt an die Angaben des Herstellers (Scleicher & Schuell GmbH, Kassel).

Eines der Dreiecke eines Isocode® Stix wurde unter Vermeidung von Kontaminationen in ein steriles, mit 500 µl aqua bidest. gefülltes 1,5 ml Cap gegeben und für 30 s gevortext. Die Spitze musste dann mit einer sterilen Pinzette oder Pipettenspitze in ein mit 50 µl aqua bidest. gefülltes 0,5 ml Cap überführt werden.

Im Mastercycler® Gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) wurde dann die DNA bei 98 °C innerhalb von 15 min. aus den Spitzen herausgekocht.

Anschließend musste jedes Cap für 1 min. gevortext werden. Danach konnte die Spitze des Stix aus dem Cap entfernt werden. In den 50 µl Flüssigkeit war nun die DNA in einer Konzentration von ca. 5 ng/µl enthalten, die bis zum weiteren Gebrauch bei –20°C gelagert wurde.

4.7. Nachweis des FcγRIIa-Polymorphismus mittels PCR

4.7.1. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Methode wurde von Kary Mullis, zum damaligen Zeitpunkt Mitarbeiter der Firma Cetus in Kalifornien, im Jahre 1985 entwickelt (Mullis et al. 1986).

Die PCR ist eine in vitro-Technik, mit der man gezielt Desoxyribonucleinsäure-(DNA) Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann. Man benötigt hierzu eine DNA-Matrize, einen Puffer, MgCl₂, dNTPs (Desoxynucleosidtriphosphate), Primer und eine DNA-Polymerase. Es handelt sich dabei um ein zyklisches Verfahren, bei dem sich in jeder neuen Runde die Anzahl der DNA-Kopien exponentiell vermehrt. Man trennt die Stränge der Ausgangs-DNA (Template) durch Erhitzen (Denaturierung) und kühlt die Reaktion anschließend ab, damit sich die zwei spezifischen Primer (Sense und Antisense), zwischen denen die zu amplifizierende Sequenz liegt, an die nun einzelsträngige DNA anlagern können (Annealing). In einem dritten Schritt werden die Primer durch eine DNA-Polymerase verlängert (Elongation), wenn alle vier dNTPs in einem geeigneten Puffer gelöst sind. So entstehen Kopien der ursprünglichen Zielregion. Diesen Zyklus wiederholt man mehrere Male, um eine Vielzahl von Kopien der Zielregion zu erhalten. Zur Überprüfung der PCR wird die vervielfältigte DNA charakterisiert, um sicherzugehen, dass die Reaktion gelungen ist. Dies funktioniert am einfachsten, indem man einen Teil des PCR-Produktes auf einem Agarosegel auftrennt und die Banden durch Färbung mit Ethidiumbromid - einem Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert - und UV-Bestrahlung sichtbar macht. Mit einer Photographie des Gels werden die Ergebnisse dokumentiert und können so ausgewertet werden.

4.7.2. Verwendete Materialien

Primer

Die Primer dienen als „Starthilfe“ für die PCR.

Es wurden 2 verschiedene Sense-Primer verwendet (Flesch et al. 1998):

Ein 131H-spezifischer Sense-Primer 131H (5'-ATCCCAGAAATTCTCCCA-3') und ein 131R-spezifischer Sense-Primer 131R (5'-ATCCCAGAAATTCTCCCG-3').

Außerdem wurde ein Antisense-Primer 131R/131H rev

(5'-CAATTTTGCTGCTATGGGC-3') (Reilly et al. 1994) für beide Sense-Primer verwendet.

Für die Positivkontrolle wurden als Primer die beiden Human Growth Hormone (HGH) HGH-I (5'-CAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3') und

HGH-II (5'-ATCCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3') (Bein et al. 1992) verwendet.

Alle Primer wurden von der Firma MWG, Eberberg synthetisiert.

Polymerase, Puffer und MgCl₂

Zwei verschiedene Polymerasen wurden in die Untersuchung einbezogen und unabhängig voneinander eingesetzt:

- HotStarTaq™ einschließlich PCR-Komponenten 10x Puffer mit 15 mM MgCl₂, 25 mM MgCl₂-Stammlösung und 5x Q-Solution (ändert das Schmelzverhalten der DNA und kann bei PCR-Systemen benutzt werden, die nicht unter Standardbedingungen laufen, um diese zu optimieren) (Qiagen, Hilden)
- Taq DNA Polymerase einschließlich PCR-Komponenten 10x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl₂, 10x PCR-Puffer ohne MgCl₂ und 25 mM MgCl₂-Stammlösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

dNTPs (Desoxynucleosidtriphosphate)

Es wurde ein Mix der 4 dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) dATP, dCTP, dGTP und dTTP verwendet, wovon jedes zu 10 mM enthalten ist.

4.7.3. Vorgehen bei der PCR

Der Nachweis des FcγRIIa-131H (131H) und des FcγRIIa-131R (131R) Allels wurde mit Hilfe einer allelspezifischen PCR durchgeführt.

Sämtliche Materialien, die für die PCR notwendig waren, wurden bis zum Gebrauch bei -20 C° im Gefrierschrank gelagert. Kurz vor Ihrer Verwendung wurden sie aufgetaut und dann direkt auf Eis gelegt. Für jeden der beiden Allotypen wurde ein Mastermix aus allen für die Reaktion nötigen Komponenten, also Puffer, MgCl₂, dNTPs, den entsprechenden Primern und Taq-Polymerase erstellt. Zur Volumenergänzung wurde

aqua bidest. zugefügt. Der Mastermix wurde anzahlmäßig entsprechend der zu untersuchenden Proben einschließlich der Negativkontrolle in PCR-Caps pipettiert. Anschließend wurde dem Inhalt der Caps die zu untersuchende DNA zugegeben. Dann wurden die Caps in den Mastercycler® Gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) gegeben und die PCR in diesem ausgeführt. Nach Beendigung der PCR wurden je 1/5 eines jeden PCR-Produkts in einer Agarosegelelektrophorese eingesetzt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und danach ausgewertet. Um die für die Reaktion nötigen optimalen Konzentrationsverhältnisse der PCR-Komponenten zu ermitteln, waren mehrere Versuchsreihen erforderlich.

4.7.4. Nachweismethode für das 131R-Allel

Zum Nachweis des 131R Allels sollte eine Multiplex-PCR unter Verwendung von allelspezifischen Primern mit zwei Primerpaaren durchgeführt werden. Zum einen mit dem Primerpaar 131R / 131R/131H rev zum Nachweis des 131R Allels sowie dem Primerpaar HGH-I / HGH-II als interne Postitivkontrolle.

In mehreren Testreihen (im Folgenden numeriert) sollten die optimalen Konzentrationsverhältnisse der einzelnen Komponenten ermittelt werden.

1) Für die ersten Reaktionsansätze wurde die Taq DNA Polymerase von Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) inklusive aller mitgelieferten dazugehörigen Komponenten wie 10x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl₂ und 25 mM MgCl₂-Stammlösung verwendet. In den Reaktionsansätzen für die PCR waren in jeder Testreihe je 25 ng genomischer DNA, 0,2 µM eines jeden Primers (MWG, Ebersberg), 200 µM dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), 2,5 U Taq DNA Polymerase und 1x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) enthalten. Zur Optimierung der Amplifikation wurden den Reaktionsansätzen unterschiedliche MgCl₂-Konzentrationen (von 1,0 bis 5,0 mM) aus einer 25 mM MgCl₂-Stammlösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugesetzt, um die optimale MgCl₂-Konzentration zu finden. Die Reaktionsansätze wurden mit aqua bidest. auf ein Volumen von 100 µl ergänzt.

Die PCR wurde im Mastercycler® Gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) ausgeführt. Das entsprechende Programm sah folgendermaßen aus:

- 1 Zyklus á 2 Min. bei 95 °C (Initiale Denaturierung)
- 10 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 57 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 22 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 54 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 1 Zyklus á 5 Min. bei 72 °C (Finale Elongation)

2) Für weitere Testreihen wurden Reaktionsansätze mit der HotStarTaq™-Polymerase einschließlich des mitgelieferten 10x PCR-Puffers mit 15 mM MgCl₂ und 25 mM MgCl₂-Stammlösung (Qiagen, Hilden) angesetzt.

In jedem Reaktionsansatz für die PCR waren 25 ng genomische DNA, 0,2 µmol eines jeden Primers (MWG, Ebersberg), 200 µmol dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), 2,5 U HotStarTaq™ sowie 1x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ (beides Qiagen, Hilden) enthalten. Auch hier wurden zur Optimierung der Amplifikation den Reaktionsansätzen unterschiedliche MgCl₂-Konzentrationen (von 0,5 bis 3,5 mM) aus einer 25 mM MgCl₂-Stammlösung (Qiagen, Hilden) zugesetzt. Die Reaktionsansätze wurden mit aqua bidest. auf ein Volumen von 100 µl ergänzt.

Die PCR wurde im Mastercycler® Gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) ausgeführt. Das entsprechende Programm sah folgendermaßen aus:

- 1 Zyklus á 15 Min. bei 95 °C (Initiale Denaturierung)
- 10 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 57 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 22 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 54 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 1 Zyklus á 5 Min. bei 72 °C (Finale Elongation)

3) Im endgültigen Reaktionsansatz für die PCR waren 25 ng genomische DNA, 0,2 µmol eines jeden Primers (MWG, Ebersberg), 200 µmol dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), 5 mM MgCl₂, 2,5 U HotStarTaq™ sowie 1x Puffer (alles Qiagen, Hilden) enthalten. Der Reaktionsansatz wurde mit aqua bidest. auf ein Volumen von 100 µl ergänzt (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: PCR-Komponenten 131R

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10xPCR Puffer/15 mM MgCl ₂	10 µl	1x; 1,5 mM MgCl ₂
25 mM MgCl ₂	14 µl	3,5 mM
dNTP Mix (je 10 mM)	2 µl	200 µmol
Primer 131H	2 µl	0,2 µmol
Primer 131R/131H rev	2 µl	0,2 µmol
Primer HGH-I	2 µl	0,2 µmol
Primer HGH-II	2 µl	0,2 µmol
HotStarTaq™	0,5 µl	2,5 U
aqua bidest.	60,5 µl	-
genomische DNA	5 µl	25 ng
Gesamt	100 µl	-

Die PCR wurde im Mastercycler® Gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) nach folgendem Protokoll ausgeführt:

- 1 Zyklus á 15 Min. bei 95 °C (Initiale Denaturierung)
- 10 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 57 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 22 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 54 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 1 Zyklus á 5 Min. bei 72 °C (Finale Elongation).

4.7.5. Nachweismethode für das 131H-Allel

Zum Nachweis des 131H-Allels wurden verschiedene Testreihen (im Folgenden numeriert) durchgeführt, um die optimalen Komponenten und Konzentrationsverhältnisse für die PCR zu ermitteln. Für das 131H-Allel wurde das allelspezifische Primerpaar 131H / 131R/131H rev benutzt. Für die Positivkontrolle wurde, wie beim Nachweis des 131R-Allels, das Primerpaar HGH-I / HGH-II verwendet.

1) Für die ersten Reaktionsansätze wurde analog zu den Ansätzen für das 131R-Allel die Taq DNA Polymerase von Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) einschließlich aller mitgelieferten dazugehörigen Komponenten wie 10x PCR-Puffer mit 15 mM $MgCl_2$ und 25 mM $MgCl_2$ -Stammlösung verwendet. Es sollte eine Multiplex-PCR durchgeführt werden. In den Reaktionsansätzen für die PCR waren in jeder Testreihe je 25 ng genomischer DNA, 0,2 μM eines jeden Primers (MWG, Ebersberg), 200 μM dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), 2,5 U Taq DNA Polymerase und 1x PCR-Puffer mit 1,5 mM $MgCl_2$ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) enthalten. Zur Optimierung der Amplifikation wurden den Reaktionsansätzen unterschiedliche $MgCl_2$ -Konzentrationen (von 1,0 bis 5,0 mM) aus einer 25 mM $MgCl_2$ -Stammlösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugesetzt. Die Reaktionsansätze wurden mit aqua bidest. auf ein Volumen von 100 μl ergänzt. Es wurden mehrere Testreihen mit der DNA von verschiedenen Individuen durchgeführt. Die PCR lief im Mastercycler® Gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) unter folgenden Bedingungen ab:

- 1 Zyklus á 2 Min. bei 95 °C (Initiale Denaturierung)
- 10 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 57 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 22 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 54 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 1 Zyklus á 5 Min. bei 72 °C (Finale Elongation)

Für alle weiteren Testreihen wurden die Reaktionsansätze mit der HotStarTaq™-Polymerase einschließlich des mitgelieferten 10x PCR-Puffers mit 15 mM MgCl₂ und 25 mM MgCl₂-Stammlösung (Qiagen, Hilden) angesetzt. Zusätzlich wurde bei einigen Testreihen noch die ebenfalls mitgelieferte 5x Q-Solution (Qiagen, Hilden) zugesetzt. Diese soll laut Herstellerangaben die Amplifikation erleichtern, indem sie das Schmelzverhalten der DNA modifiziert.

2) In jedem Reaktionsansatz für die Multiplex-PCR waren 25 ng genomische DNA, 0,2 µmol eines jeden Primers (MWG, Ebersberg), 200 µmol dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), 2,5 U HotStarTaq™ sowie 1x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ (beides Qiagen, Hilden) enthalten. Auch hier wurden zur Optimierung der Amplifikation den Reaktionsansätzen unterschiedliche MgCl₂-Konzentrationen (von 0,5 bis 3,5 mM) aus einer 25 mM MgCl₂-Stammlösung (Qiagen, Hilden) zugesetzt, um die optimale MgCl₂-Konzentration zu finden. Die Reaktionsansätze wurden mit aqua bidest. auf ein Volumen von 100 µl ergänzt.

Die PCR wurde im Mastercycler® Gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) mit folgendem Programm ausgeführt:

- 1 Zyklus á 15 Min. bei 95 °C (Initiale Denaturierung)
- 10 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 57 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 22 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 54 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 1 Zyklus á 5 Min. bei 72 °C (Finale Elongation)

3) Jeder Reaktionsansatz dieser Testreihe für die Multiplex-PCR bestand aus 25 ng genomischer DNA, 0,2 µmol eines jeden Primers (MWG, Ebersberg), 200 µmol dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), 2,5 U HotStarTaq™ sowie 1x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ (beides Qiagen, Hilden). Auch hier wurden zur Optimierung der Amplifikation den Reaktionsansätzen unterschiedliche MgCl₂-Konzentrationen (von 0,5 bis 3,5 mM) aus einer 25 mM MgCl₂-Stammlösung (Qiagen, Hilden) zugesetzt. Zusätzlich wurden den Ansätzen noch 20 µl 1x Q-Solution

beigemischt. Die Reaktionsansätze wurden mit aqua bidest. auf ein Volumen von 100 µl ergänzt. Die PCR wurde im Mastercycler® Gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) ausgeführt. Das entsprechende Programm sah folgendermaßen aus:

- 1 Zyklus á 15 Min. bei 95 °C (Initiale Denaturierung)
- 10 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 57 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 22 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 54 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 1 Zyklus á 5 Min. bei 72 °C (Finale Elongation)

4) Bei dieser Testreihe setzten sich die Ansätze für die Multiplex-PCR aus 12,5 ng genomischer DNA, 0,2 µmol eines jeden Primers (MWG, Ebersberg), 200 µmol dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), 2,5 U HotStarTaq™, 1x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ und 20 µl 1x Q-Solution (alles Qiagen, Hilden) zusammen. Den Reaktionsansätzen waren unterschiedliche MgCl₂-Konzentrationen (0,5 bis 3,5 mM) aus einer 25 mM MgCl₂-Stammlösung (Qiagen, Hilden) zugesetzt. Die Reaktionsansätze wurden mit aqua bidest. auf ein Volumen von 100 µl ergänzt.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen im Mastercycler® Gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) ausgeführt:

- 1 Zyklus á 15 Min. bei 95 °C (Initiale Denaturierung)
- 10 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 57 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 22 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 54 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 1 Zyklus á 5 Min. bei 72 °C (Finale Elongation)

5) Bei dieser weiteren Testreihe wurden die Reaktionsansätze für eine Multiplex-PCR, wie unter 4) beschrieben, fast komplett übernommen. Nur die MgCl_2 -Konzentrationen aus einer 25 mM MgCl_2 -Stammlösung (Qiagen, Hilden) wurden geringfügig geändert (von 0,5 bis 3,0 mM). Die Bedingungen für die Amplifikation im Mastercycler® Gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) wurden aber abgeändert:

- 1 Zyklus á 15 Min. bei 95 °C (Initiale Denaturierung)
- 35 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 50 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 1 Zyklus á 5 Min. bei 72 °C (Finale Elongation)

6) Die Ansätze für diese Multiplex-PCR setzten sich aus 12,5 ng genomischer DNA, 0,2 µmol eines jeden Primers (MWG, Ebersberg), 200 µmol dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), 2,5 U HotStarTaq™, 1x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl_2 und 20 µl 1x Q-Solution (alles Qiagen, Hilden) zusammen. Den Reaktionsansätzen waren unterschiedliche MgCl_2 -Konzentrationen (von 0,5 bis 1,5 mM) aus einer 25 mM MgCl_2 -Stammlösung (Qiagen, Hilden) zugesetzt. Die Reaktionsansätze wurden mit aqua bidest. auf ein Volumen von 100 µl ergänzt.

Die PCR wurde mit einem neuen PCR-Programm im Mastercycler® Gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) ausgeführt. Bei diesem neuen PCR-Programm wurde ein Gradient programmiert, um mehrere identische Ansätze gleichzeitig verschiedenen Reaktionsbedingungen auszusetzen.

Das entsprechende Programm sah folgendermaßen aus:

- 1 Zyklus á 15 Min. bei 95 °C (Initiale Denaturierung)
- 35 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei Gradient 50 °C/ 52 °C/ 54 °C/ 56 °C/ 58 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 1 Zyklus á 5 Min. bei 72 °C (Finale Elongation)

7) Im endgültigen Reaktionsansatz für die PCR zum Nachweis des 131H Allels wurden dann sowohl die Primeranteile als auch der Anteil der DNA wieder erhöht und das gleiche PCR-Programm wie für 131R verwendet.

Im einem Ansatz waren enthalten (s. Tabelle 2): 25 ng genomische DNA, je 0,5 µmol der Primer 131H , 131R/131H rev, HGH-I und HGH-II (MWG, Ebersberg), 200 µmol dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), 2,5 mM MgCl₂, 2,5 U HotStarTaq™, 1x Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ sowie 1x Q-Solution (alles Qiagen, Hilden). Der Reaktionsansatz wurde mit aqua bidest. auf ein Volumen von 100 µl ergänzt.

Tabelle 2: PCR-Komponenten 131H

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10xPCR Puffer/15 mM MgCl ₂	10 µl	1x; 1,5 mM MgCl ₂
25 mM MgCl ₂	4 µl	1 mM
dNTP Mix (je 10 mM)	2 µl	200 µmol
Primer 131H	5 µl	0,5 µmol
Primer 131R/131H rev	5 µl	0,5 µmol
Primer HGH-I	5 µl	0,5 µmol
Primer HGH-II	5 µl	0,5 µmol
HotStarTaq™	0,5 µl	2,5 U
Q-Solution	20 µl	1x
aqua bidest.	38,5 µl	-
genomische DNA	5 µl	25 ng
Gesamt	100 µl	-

Das PCR-Programm wurde im Mastercycler® Gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) ausgeführt:

- 1 Zyklus á 15 Min. bei 95 °C (Initiale Denaturierung) zur Aktivierung der HotStarTaq™
- 10 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 57 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 22 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C (Denaturierung)
2 Min. bei 54 °C (Annealing)
1 Min. bei 72 °C (Elongation)
- 1 Zyklus á 5 Min. bei 72 °C (Finale Elongation)

4.7.6. Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR und für die Auswertung der Ergebnisse wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Dazu wurden 1g Agarose (MetaPhor®-Agarose, Biozym, Hess. Oldendorf) auf 50 ml einer 2% TAE-Pufferlösung (Tris-Acetat-EDTA-Puffer, bestehend aus 40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA, 0,2 µg/ml Ethidiumbromid, pH 8,3) gegeben, 2,5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und alles auf einer Heizplatte unter ständigem Rühren zum Kochen gebracht. Danach wurde die jetzt relativ zähe Flüssigkeit auf ca. 60-70 °C unter weiterem ständigem Rühren abgekühlt. Das Gel wurde anschließend blasenfrei in die Gelkammer des Elektrophoresegerätes (Biorad, Glattdbrugg, Schweiz) eingefüllt und kühlgestellt. Nach Beendigung des Polymerisationsvorganges wurde das Gel im Gelkasten mit TAE-Pufferlösung vollständig bedeckt. In die entstandenen Kammern im Gel wurden nun jeweils die wie folgt vorbereiteten PCR-Endprodukte pipettiert: Von jedem Endprodukt einer jeden PCR wurden jeweils 20 µl entnommen und mit 1 µl Loading Buffer, bestehend aus 40% Ficoll (Pharmacia Biotech, Schweden), 0,05% Bromphenolblau und 0,05% Xylencyanol (beides Merck, Darmstadt) vermischt.

In die erste Kammer wurde ein Größenmarker (DNA Molecular Weight Marker VIII, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) aufgetragen, um dann später nach Sichtbarmachen unter UV-Licht die Größe der entstandenen Banden ablesen bzw. errechnen zu können.

Hierzu wurde als Größenmarker die 100-Basenpaare- (bp-) Leiter (100 bpl) verwendet. Mit Hilfe eines Elektrophoresegerätes (Biorad, Glattdbrugg, Schweiz) wurden die Banden aufgetrennt.

Die Elektrophorese lief unter folgenden Bedingungen ab: zuerst 30 Minuten bei 60 V, dann 30 Minuten bei 100 V.

Das 131R-Allel und das 131H-Allel resultierte in einer Bande bei 253 bp (Basenpaare), die HGH-Positivkontrolle bei 439 bp.

Zur Dokumentation und für Auswertungszwecke wurde eine Fotografie des auf dem UV-Transilluminator liegenden Gelblockes gemacht. Da bei der PCR allelspezifische Primer benutzt wurden, entfielen weitere Analysemethoden, so dass die entstandenen Banden danach direkt ausgewertet werden konnten.

4.8. Sequenzierung der PCR-Produkte

Zur Verifizierung und Kontrolle der Methode wurde extern durch die Firma Agowa GmbH (Berlin, Deutschland) eine Barcode-Sequenzierung durchgeführt. Hierzu wurden DNA-Proben von zwei zufällig ausgewählten 131R-homozygoten und 131H-homozygoten Individuen aufbereitet. Mit beiden Proben wurde erneut eine PCR durchgeführt. Dazu wurden 5 µl (25ng) der DNA mit 10 µl PCR-Puffer (Konzentration 1x mit 1,5 mM MgCl₂), 4 µl MgCl₂ (1 mM), 2 µl dNTP-Mix (200 µM), 20 µl Q-Solution (Konzentration 1x), 0,5 µl HotStarTaq™ (2,5 U), 2 µl Primer 131R/131H rev (0,2 µM) und 54,5 µl aqua bidest angesetzt. Dem Ansatz für 131R wurden 2 µl Primer 131R (0,2 µM), dem Ansatz für 131H 2 µl Primer 131H (0,2 µM) zugefügt und eine PCR im Mastercycler® Gradient unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1 Zyklus 15 Min. bei 95 °C, dann 35 Zyklen mit 1 Min. bei 94 °C, 2 Min. bei 54°C, 1 Min. bei 72°C und abschließend 1 Zyklus 5 Min. bei 72 °C. Zur Erfolgskontrolle der PCR wurden die Produkte nach Gelelektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Die PCR-Produkte wurden dann entsprechend den Vorgaben der Agowa GmbH aufbereitet. Von dem aufgereinigten PCR-Produkt wurden 10 µl in einer Konzentration von 10ng/µl zusammen mit 4 µl des zugehörigen senseprimers 131R bzw. 131H (Konzentration 5pmol/µl) in ein 1,5ml Cap gegeben, mit einem barcode-label versehen und zur Agowa GmbH (Berlin, Deutschland) versendet. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden dann per e-mail übermittelt.

4.9. Statistische Auswertung

Anhand der entstandenen Banden bei der Gelelektrophorese konnten die einzelnen Probanden und Patienten exakt klassifiziert werden.

Die aus den Fotos abgelesenen Ergebnisse für die einzelnen Probanden und Patienten wurden mit dem Programm Microsoft® Excel (Version 2000, Microsoft Corp., USA) erfasst und grafisch ausgewertet.

Für die statistische Analyse der Genotypverteilung wurde der “Fisher’s Exact Test“ verwendet. Als statistisch signifikant gilt $p < 0,05$. Zur Überprüfung, ob der Genotyp in den beiden Gruppen unterschiedlich häufig auftritt, wurde –unter Berücksichtigung des Geschlechts und des Alters- eine logistische Regression durchgeführt. Als Maß für die unterschiedliche Häufigkeit des Auftretens in den beiden Kollektiven wurde das Odds Ratio bestimmt.

Zur Beschreibung der klinischen Situation von Patienten und Probanden wurden die klinischen Parameter PI, PBI, SB, ST und AL erhoben und ausgewertet. Außerdem wurde das Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung festgehalten. Auch diese Daten wurden nach Erhebung mit Microsoft® Excel (Version 2000, Microsoft Corp., USA) tabellarisch erfasst.

Da diese Daten nicht der Normalverteilung folgen, wurden diese durch den Medianwert als Lageparameter, das 1. und 3. Quartil als Streuungsmaße und Minimum und Maximum als Einzelwerte beschrieben. Extremwerte wurden mit „*“ und Ausreißer mit „o“ in den Diagrammen gekennzeichnet. Die ausgewerteten klinischen Parameter wurden grafisch als Boxplots mit Hilfe des Programms SPSS (SPSS für Microsoft Windows, Version 15.0) dargestellt.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit der Software SAS (Version 7.0, SAS Institute Inc., North Carolina, USA) sowie SPSS (SPSS für Microsoft Windows, Version 15.0).

Die Durchführung der statistischen Analysen wurde durch Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Informatik, AG Medizinische Statistik der JLU Giessen beratend begleitet.

5. Ergebnisse

In den ersten beiden Teilen dieses Kapitels sind Nachweismethoden für das 131R- und das 131H-Allel dargestellt. Auf die Angabe der Zusammensetzungen der Reaktionsansätze für die einzelnen PCR's und die PCR-Protokolle wurde in diesem Kapitel verzichtet, da diese schon ausführlich in den Kapiteln 4.7.4 und 4.7.5 beschrieben sind. Entsprechende Verweise sind im Text angegeben.

Der dritte Teil beschreibt kurz die Ergebnisse der extern durchgeführten Sequenzierung der PCR-Produkte, um die angewandte Nachweismethode zu verifizieren.

Im vierten Teil werden die möglichen FcγRIIa-Genotypen beschrieben und grafisch anhand von Fotos dargestellt. Desweiteren wird auf die Ergebnisse bezüglich der Genotyphäufigkeiten und deren Verteilung sowie der Verteilung der Allele bei den beiden Testgruppen eingegangen.

Der fünfte Teil stellt die Ergebnisse der deskriptiven Datenanalyse bezüglich der Altersstruktur der Patienten und Probanden und sämtlicher klinischer Daten (PI, PBI, SB, ST und AL) tabellarisch und grafisch anhand von Boxplots dar.

Alle erhobenen klinischen Werte sowie die Ergebnisse der Genotypisierung werden zwischen der Gruppe 0-Probanden (parodontal gesunde Individuen) und der Gruppe 1-Patienten (Individuen mit aggressiver Parodontitis) verglichen.

5.1. Nachweis der Allele 131R und 131H mit allelspezifischen Primern

Mit den aus den Testreihen (s. Kapitel 4.7.4 und 4.7.5) gewonnenen Erkenntnissen war es möglich, einen reproduzierbaren Reaktionsansatz zusammenzusetzen, um die DNA verschiedener Individuen auf die beiden Allele 131R und 131H hin zu untersuchen. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze der einzelnen Testreihen sowie die dazugehörigen PCR-Programme sind unter Kapitel 4.7.4 und Kapitel 4.7.5 genau beschrieben. Für die Amplifikation im Mastercycler® Gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) hat sich die Kombination aus 10 Zyklen bei 57 °C und anschließend 22 Zyklen bei 54 °C Annealingtemperatur für die PCR als optimal erwiesen.

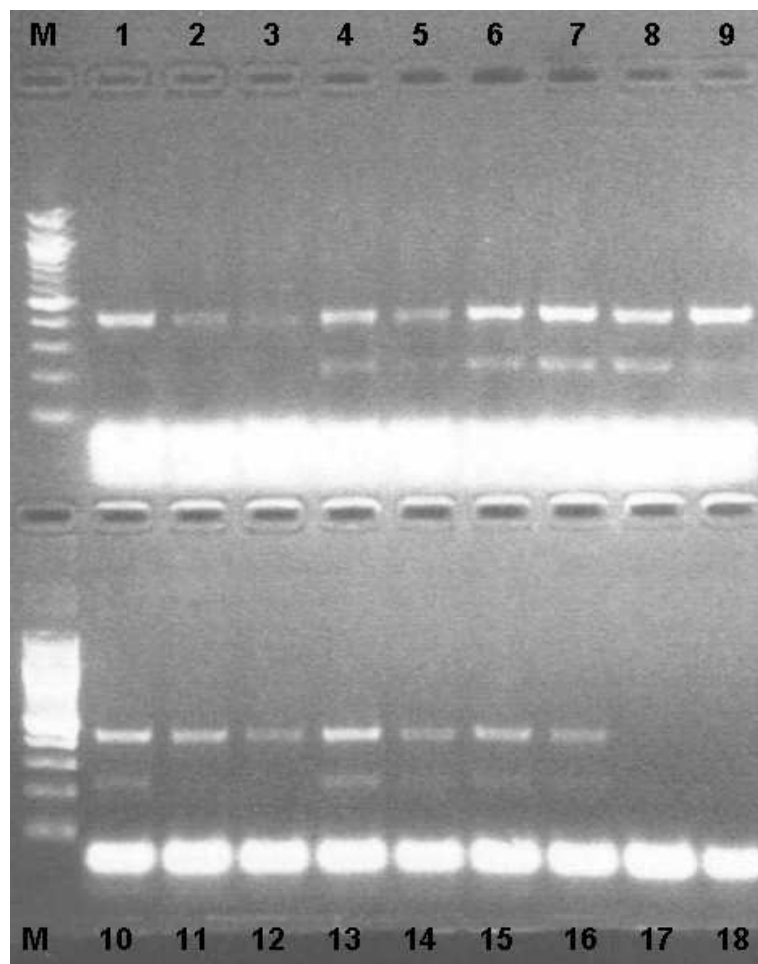


Abbildung 2: PCR-Analyse für 131R und 131H.

(M=Größenmarker 100 bpl; Gelkammer 1-9: PCR-Produkte 131R mit unterschiedlicher DNA; Gelkammer 10-16 PCR-Produkte 131H mit unterschiedlicher DNA; 17=Negativkontrolle 131R, 18=Negativkontrolle 131H)

Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse verschiedener DNA-Proben nach PCR und Gelelektrophorese für 131R und 131H, in Tabelle 3 und Tabelle 4 sind die Pipettierschemata, die Endkonzentrationen der Komponenten und die PCR-Programme dargestellt.

Tabelle 3: Pipettierschema und PCR-Programm für den Nachweis des 131R-Allels

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10xPCR Puffer/15 mM MgCl ₂	10 µl	1x; 1,5 mM MgCl ₂
25 mM MgCl ₂	14 µl	3,5 mM
dNTP Mix (je 10 mM)	2 µl	200 µmol
Primer 131R	2 µl	0,2 µmol
Primer 131R/131H rev	2 µl	0,2 µmol
Primer HGH-I	2 µl	0,2 µmol
Primer HGH-II	2 µl	0,2 µmol
HotStarTaq™	0,5 µl	2,5 U
aqua bidest.	60,5 µl	-
genomische DNA	5 µl	25 ng
Gesamt	100 µl	-
PCR-Programm	-1 Zyklus 15 min. bei 95°C -10 Zyklen 1 min. bei 94°C, 2 min. bei 57°C, 1 min. bei 72°C -22 Zyklen 1 min. bei 94°C, 2 min. bei 54°C, 1 min. bei 72°C -1 Zyklus 5 min. bei 72°C	

Tabelle 4: Pipettierschema und PCR-Programm für den Nachweis des 131H-Allels

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10xPCR Puffer/15 mM MgCl ₂	10 µl	1x; 1,5 mM MgCl ₂
25 mM MgCl ₂	4 µl	1 mM
dNTP Mix (je 10 mM)	2 µl	200 µmol
Primer 131R	5 µl	0,5 µmol
Primer 131R/131H rev	5 µl	0,5 µmol
Primer HGH-I	5 µl	0,5 µmol
Primer HGH-II	5 µl	0,5 µmol
HotStarTaq™	0,5 µl	2,5 U
Q-Solution	20 µl	1x
aqua bidest.	38,5 µl	-
genomische DNA	5 µl	25 ng
Gesamt	100 µl	-
PCR-Programm	-1 Zyklus 15 min. bei 95°C -10 Zyklen 1 min. bei 94°C, 2 min. bei 57°C, 1 min. bei 72°C -22 Zyklen 1 min. bei 94°C, 2 min. bei 54°C, 1 min. bei 72°C -1 Zyklus 5 min. bei 72°C	

5.2. Ergebnisse der Sequenzierung der PCR-Produkte

Die von der Agowa GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführte Sequenzierung der Proben 131R und 131H wurden per e-mail übermittelt. Die Sequenzierung lieferte dieselben Ergebnisse wie bei der entsprechenden PCR. An der Stelle des Polymorphismus A→G war bei der Probe 131H im Chromatogramm nur ein Signal für die Base A (Adenin) zu sehen. Bei der Probe 131R war an derselben Stelle ein Signal für die Base G (Guanin) vorhanden. Die Probe 131H hat somit den Genotyp 131H/131H, die Probe 131R den Genotyp 131R/131R. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die angewandte Methode sichere Ergebnisse liefert.

5.3. Verteilung der FcγRIIa-Genotypen und Häufigkeit der Allele

Folgende Genotypen sind möglich (s. Abbildung 3):

- a) 131H-homozygot (131H/131H)=Wildtyp: hierbei ist eine Bande bei 253bp für das 131H-Allel, jedoch keine für das 131R-Allel zu sehen.
- b) 131R-homozygot (131R/131R)=polymorphe Form: hierbei ist eine Bande bei 253bp für das 131R-Allel, jedoch keine für das 131H-Allel zu sehen.
- c) heterozygot (131R/131H): bei diesem Genotyp ist sowohl für das 131H-Allel, als auch für das 131R-Allel bei 253bp eine Bande zu sehen.

In Abbildung 3 sind die charakteristischen Banden bei 253bp für die beiden Allele 131H und 131R und bei 439bp für die HGH-Positivkontrolle gekennzeichnet und exemplarisch Ergebnisse mit 131H-homozygotem, 131R-homozygotem und heterozygotem Genotyp vorgestellt.

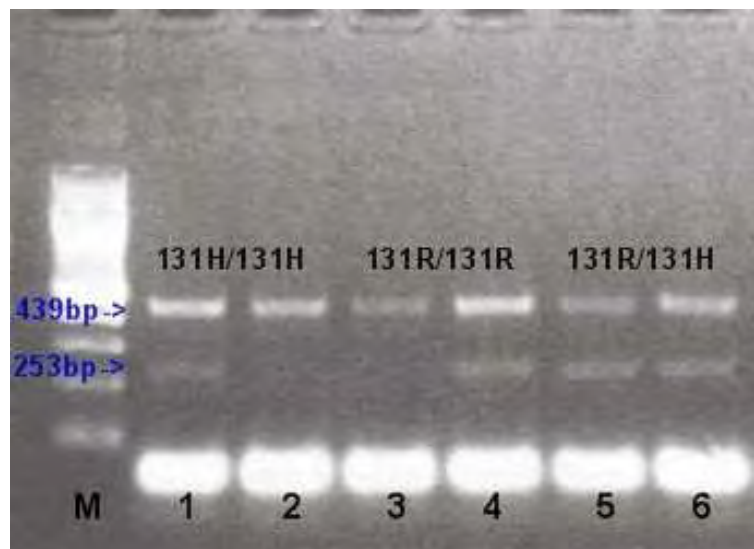


Abbildung 3: FcγRIIa-Genotypen: 1+2=131H/H; 3+4=131R/R; 5+6=131R/H

(M=Größenmarker; 1,3,5=131H-Allel (253bp) mit HGH-Positivkontrolle (439bp); 2,4,6=131R-Allel (253bp) mit HGH-Postivkontrolle (439bp))

Insgesamt liegen aus dieser Studie Ergebnisse von 96 Probanden und Patienten vor. Bei 56 Teilnehmern (58,3%) ergab sich der Genotyp 131R/131H (heterozygot), bei 25 Teilnehmern (26,1%) der Genotyp 131H/131H (131H-homozygot) und bei 15 Teilnehmern (15,6%) der Genotyp 131R/131R (131R-homozygot) (s. Abbildung 4).

In der Häufigkeit der Allele zeigt sich ein Unterschied von 44,8% für das 131R-Allel und 55,2% für das 131H-Allel, welches somit häufiger vorkam.

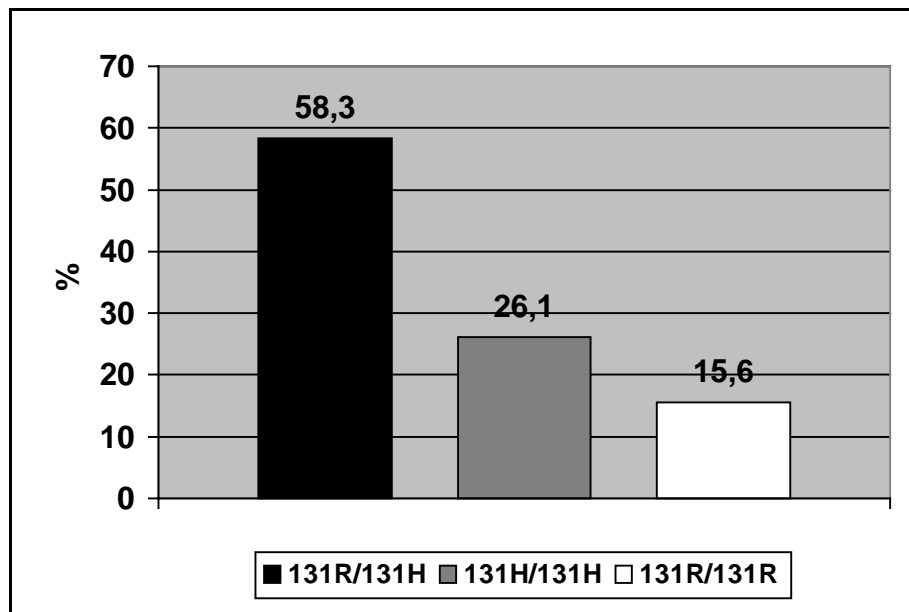


Abbildung 4: Häufigkeit der FcγRIIa-Genotypen

Die Verteilung der FcγRIIa-Genotypen und die Häufigkeit der 131H- und 131R-Allele bei Patienten und Probanden sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Verteilung der FcγRIIa-Genotypen und Häufigkeit der Allele

	Probanden n=46 (100 %)	Patienten n=50 (100 %)	Total n=96 (100 %)
Genotypen			
131R/131H	28 (60,9%)	28 (56%)	56 (58,3%)
131H/131H	15 (32,6%)	10 (20%)	25 (26,1%)
131R/131R	3 (6,5%)	12 (24%)	15 (15,6%)
Häufigkeit der Allele			
131R	(37,0%)	(52%)	(44,8%)
131H	(63,0%)	(48%)	(55,2%)

Von den 96 Personen, die sich für die Studie zur Verfügung gestellt haben, erfüllten 50 Personen die Kriterien, um der Gruppe 1 (Patienten) zugeordnet werden zu können. Die anderen 46 erfüllten die Kriterien der Gruppe 0 (Probanden) (Kriterien s. 4.4).

Bei der Kontrollgruppe hatten 60,9% den 131R/131H, 32,6% den 131H/131H und 6,5% den 131R/131R-Genotyp. Bei den Patienten zeigten 56% den 131R/131H-Genotyp, 20% den 131H/131H-Genotyp und 24% den 131R/131R-Genotyp.

Die Verteilung der Genotypen lag bei Patienten und Probanden im Hardy-Weinberg-Equilibrium ($p > 0,05$; Fisher's Exact Test). Abbildung 5 stellt grafisch nochmals die unterschiedliche Verteilung der Genotypen zwischen Patienten und Probanden dar.

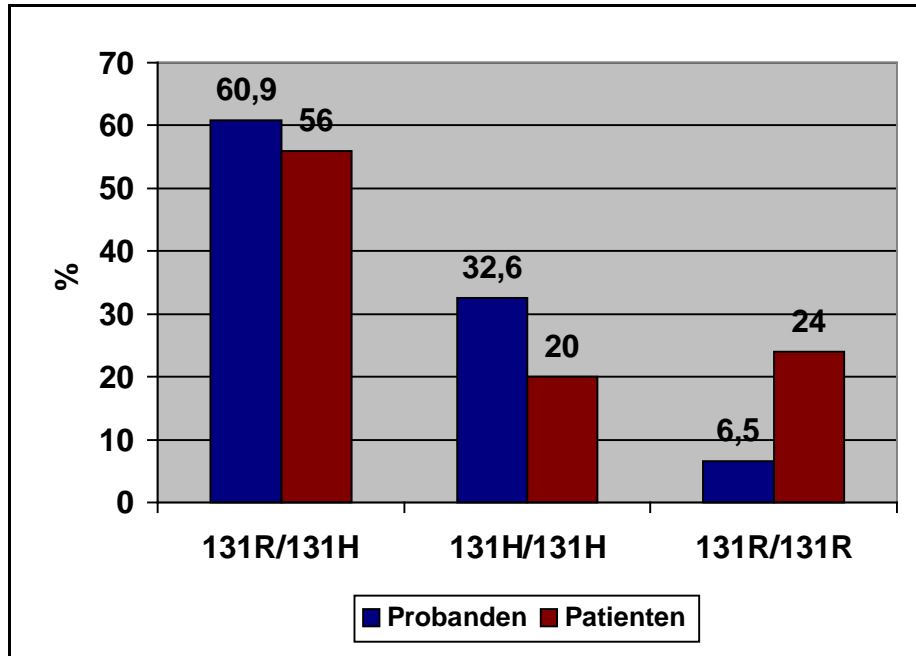


Abbildung 5: Verteilung der FcγRIIa-Genotypen bei Probanden und Patienten

Zur Überprüfung, ob die Genotypen in den Gruppen (Patienten, Probanden) unterschiedlich häufig auftreten, wurde – unter Berücksichtigung des Geschlechts und des Alters – eine logistische Regression durchgeführt und die Odds Ratio bestimmt. Dem Ergebnis der Regression kann entnommen werden, dass, wenn man den Wildtyp 131H/131H als Bezugsgröße wählt, sich Hinweise finden lassen, dass die Verteilung von 131H/131H und der polymorphen Form 131R/131R ($OR = 6,725$, 95%-Konfidenzintervall: [1,068; 42,337]) in den beiden Gruppen unterschiedlich ist, jedoch die Verteilung von Wildtyp und heterozygoter Form 131R/131H ($OR = 1,374$, 95%-Konfidenzintervall: [0,432; 4,372]) nicht unterschiedlich ist.

Als statistisch signifikant erwies sich die Verteilung der 3 FcγRIIa-Genotypen innerhalb der beiden Gruppen ($p < 0,0019$; Fisher's Exact Test). Der Vergleich des Wildtyps 131H/131H mit der polymorphen Form 131R/131R zeigte ebenso eine statistisch relevante Signifikanz ($p = 0,0131$; Fisher's Exact Test), wohingegen der Vergleich von 131H/131H mit 131R/131H nicht signifikant war ($p = 0,1363$; Fisher's Exact Test).

In der Verteilung der Häufigkeit der beiden Allele 131R und 131H zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Probanden und Patienten. 131R kommt zu 37% bei den Probanden und zu 52% bei den Patienten vor, 131H zu 63% bei den Probanden und zu 48% bei den Patienten (s. Tabelle 5).

5.4. Klinische Parameter

5.4.1. Alter

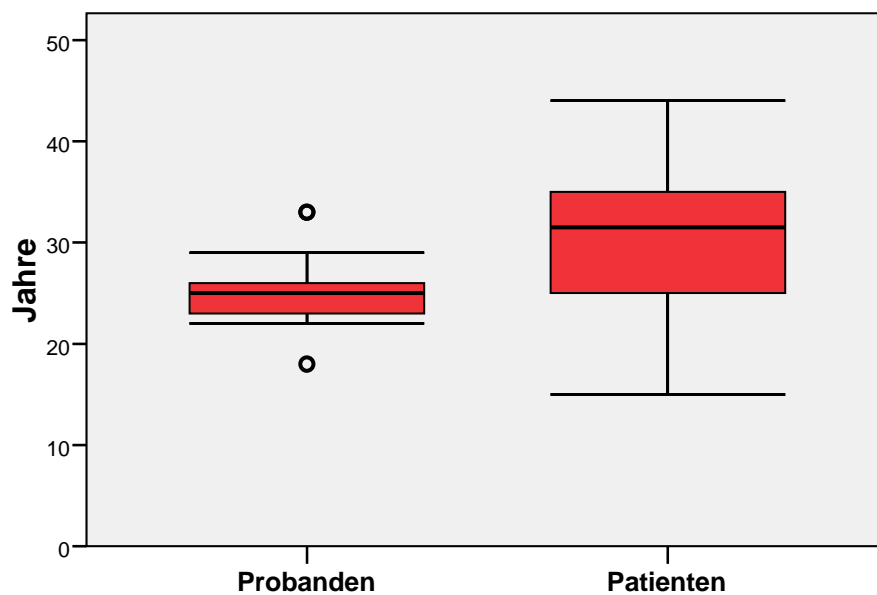


Abbildung 6: Altersverteilung in Jahren in den beiden Gruppen

Tabelle 6: Auswertung des Alters der beiden Gruppen in Jahren

Gruppen	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum
Probanden	18	23	25	26	33
Patienten	15	25	31,5	35	44

Das Alter wurde zu Beginn der Studie bestimmt. Die Patienten waren mit einem Median von 31,5 Jahren deutlich älter als die Probanden, die einen Median von 25 Jahren aufwiesen. Auch im 3.Quartil und bei den Maximumwerten differieren die beiden Gruppen erheblich.

5.4.2. Plaqueindex (PI)

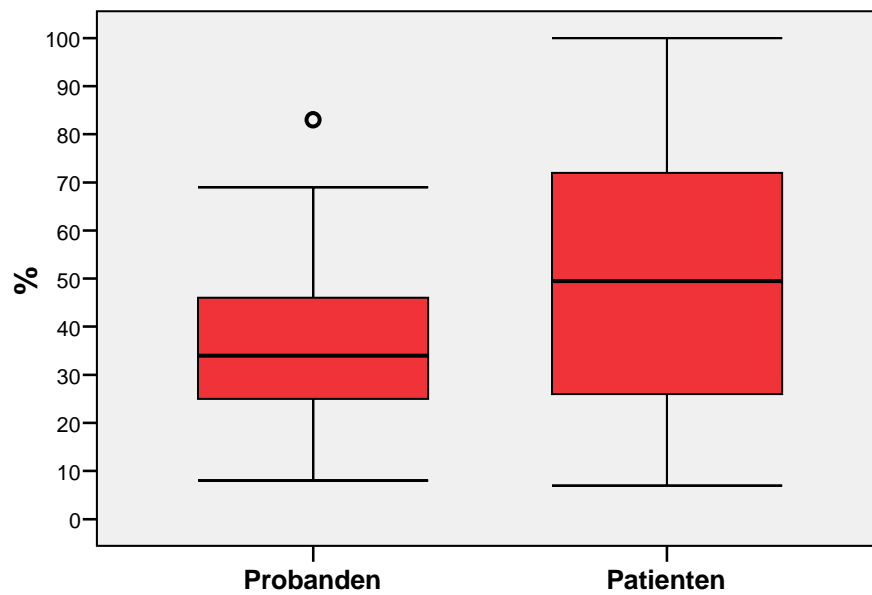


Abbildung 7: Plaqueindex (PI) in % in den beiden Gruppen

Tabelle 7: Auswertung der Plaqueindizes der beiden Gruppen in %

Gruppen	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum
Probanden	8	25	34	46	83
Patienten	7	26	50	72	100

Beim Plaqueindex (PI) ist ein signifikanter Unterschied zwischen Probanden und Patienten zu erkennen. Die Gruppe der Patienten weist mit 50% einen deutlich höheren Medianwert als die Probanden mit 34% auf. Im 1.Quartil wird dieser Unterschied mit 72% bei den Patienten und 46% bei den Probanden noch deutlicher, wohingegen die Werte für Minimum und 1.Quartil nur geringfügig voneinander abweichen.

5.4.3. Papillenblutungsindex (PBI)

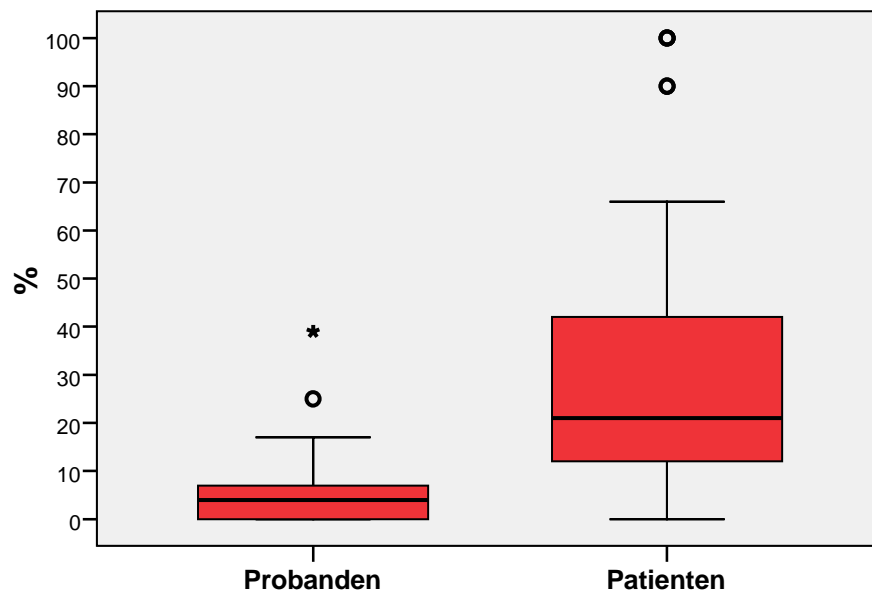


Abbildung 8: Papillenblutungsindex (PBI) in % in den beiden Gruppen

Tabelle 8: Auswertung der Papillenblutungsindizes der beiden Gruppen in %

Gruppen	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum
Probanden	0	0	4	7	39
Patienten	0	12	21	42	100

Beim Papillenblutungsindex (PBI) ist der Unterschied zwischen den beiden Gruppen noch deutlicher als beim Plaqueindex. Mit einem Medianwert von nur 4% liegen die Probanden deutlich unter dem der Patienten mit 21%. Auch beim 1.Quartil, dem 3.Quartil und dem Maximum weichen die Werte zwischen den beiden Gruppen stark voneinander ab. Lediglich beim Minimum weisen beide Gruppen mit 0% denselben Wert auf.

5.4.4. Sondierungstiefe (ST)

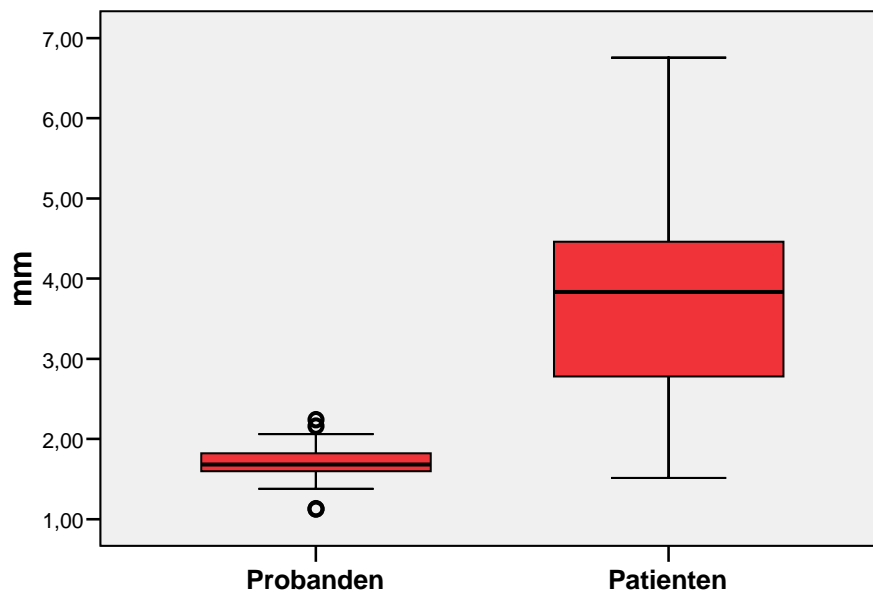


Abbildung 9: Sondierungstiefe (ST) in mm in den beiden Gruppen

Tabelle 9: Auswertung der Sondierungstiefe der beiden Gruppen in mm

Gruppen	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum
Probanden	1,13	1,60	1,68	1,82	2,24
Patienten	1,51	2,78	3,83	4,46	6,75

Auch die Sondierungstiefe zeigte als klinischer Parameter bei der Parodontitisdiagnostik eine statistisch signifikante Differenz zwischen den parodontal gesunden Probanden und den Patienten mit einer AP. Mit einem Median von 3,83 mm und einem Maximum von 6,75 mm liegen die Werte für die Patienten stark über denen der Probanden, die einen Median von 1,68 mm und ein Maximum von 2,24 mm aufweisen. Auch das 1. und das 3.Quartil differiert deutlich zwischen Probanden und Patienten. Nur beim Minimum sind die Unterschiede nicht ganz so groß.

5.4.5. Sondierungsblutung (SB)

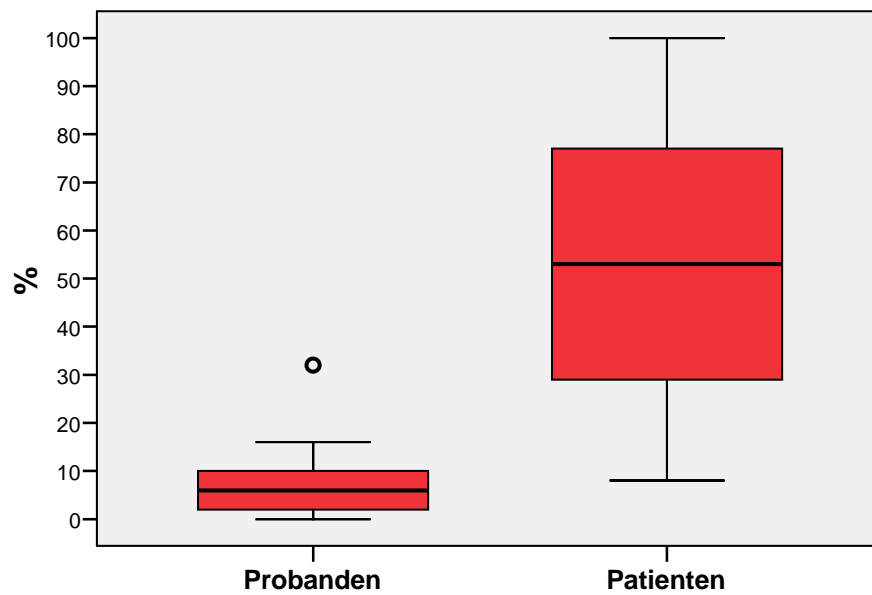


Abbildung 10: Sondierungsblutung (SB) in % in den beiden Gruppen

Tabelle 10: Auswertung der Sondierungsblutungswerte der beiden Gruppen in %

Gruppen	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum
Probanden	0	2	6	10	32
Patienten	8	29	53	77	100

Die Sondierungsblutung (ST) ist das objektivste Symptom einer parodontalen Entzündung und damit ein äußerst wichtiger klinischer Parameter bei der Parodontitisdiagnostik. Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Probanden. Bei allen Werten sind sehr deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu erkennen. Neben dem Medianwert von 53% bei den Patienten und nur 6% bei den Probanden zeigen auch alle anderen ermittelten Werte massive Abweichungen der Werte beim Vergleich der beiden Gruppen.

5.4.6. Klinischer Attachmentlevel (AL)

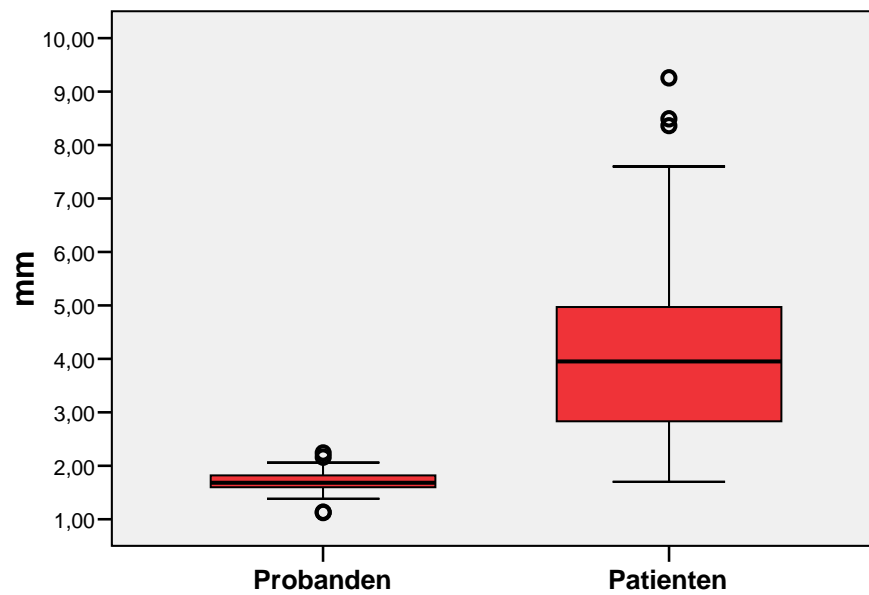


Abbildung 11: Attachmentlevel (AL) in mm in den beiden Gruppen

Tabelle 11: Auswertung des Attachmentlevels der beiden Gruppen in mm

Gruppen	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum
Probanden	1,13	1,60	1,68	1,82	2,24
Patienten	1,70	2,83	3,95	4,97	9,25

Wie auch schon bei den Sondierungstiefen liegen die Werte für die beiden Gruppen deutlich auseinander. Mit einem Medianwert von 3,95 mm und einem Maximum von 9,25 mm weisen die Patienten vielfach höhere Werte auf als die Probanden.

5.4.7. Klinische Daten der Probanden und Patienten

In Tabelle 12 sind die klinischen Daten (Mittelwert und Standardabweichung) der Probanden und Patienten einander gegenübergestellt. Diese Daten spiegeln die Einschlusskriterien der beiden Gruppen wider. Bei allen stetigen Parametern (PI, PBI, SB, ST, AL) weisen die Probanden deutlich niedrigere Werte auf als die Patienten. Nur bei der Anzahl der Zähne sind die Werte nahezu identisch. Im Durchschnitt waren die Probanden 5,5 Jahre jünger als die Patienten.

Tabelle 12: Gegenüberstellung der klinischen Daten in den verschiedenen Gruppen

	Probanden n=46	Patienten n=50	Total n=96
Alter (in Jahren) ± SA	24,9 ± 2,6	30,4 ± 6,4	27,7 ± 5,7
Anzahl der Zähne ± SA	28,5 ± 1,38	27,8 ± 2,9	28,1 ± 2,3
PI (%) ± SA (%)	35,6 ± 15,1	51,6 ± 27,8	43,7 ± 24,1
PBI (%) ± SA (%)	5,3 ± 7,2	31,7 ± 26,9	19,0 ± 24,0
SB (%) ± SA (%)	7,1 ± 6,3	53,7 ± 29,7	31,4 ± 31,9
ST (mm) ± SA (mm)	1,70 ± 0,23	3,82 ± 1,16	2,81 ± 1,36
AL (mm) ± SA (mm)	1,70 ± 0,22	4,15 ± 1,64	2,98 ± 1,71

5.4.8. Klinische Daten und FcγRIIA-Genotypen

Die Werte aller erhobenen klinischen Daten sowie des Alters der Probanden und Patienten sind in Abhängigkeit von den 3 FcγRIIa-Genotypen tabellarisch in Tabelle 13 dargestellt. Es handelt sich hierbei um die errechneten Mittelwerte mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung (SA), unterteilt in Probanden und Patienten sowie die 3 FcγRIIa-Genotypen.

Tabelle 13: Klinische Daten in den verschiedenen Gruppen und FcγRIIa-Genotypen

Probanden	Genotyp		
	131R/131H n=28	131H/131H n=15	131R/131R n=3
Alter (in Jahren) ± SA	24,9 ± 2,7	25,0 ± 2,6	23,7 ± 1,25
Anzahl der Zähne ± SA	28,5 ± 1,4	28,7 ± 1,4	27,7 ± 0,47
PI (%) ± SA (%)	34,6 ± 15,0	31,9 ± 10,4	55,5 ± 19,6
PBI (%) ± SA (%)	5,8 ± 7,6	5,2 ± 7,0	1,4 ± 1,9
SB (%) ± SA (%)	5,5 ± 4,7	10,5 ± 7,7	4,8 ± 3,7
ST (mm) ± SA (mm)	1,68 ± 0,24	1,73 ± 0,21	1,68 ± 0,09
AL (mm) ± SA (mm)	1,69 ± 0,24	1,73 ± 0,21	1,68 ± 0,09
Patienten	Genotyp		
	131R/131H n=28	131H/131H n=10	131R/131R n=12
Alter (in Jahren) ± SA	31,2 ± 6,2	28,7 ± 6,5	29,8 ± 6,6
Anzahl der Zähne ± SA	27,4 ± 3,4	28,0 ± 2,1	28,3 ± 1,7
PI (%) ± SA (%)	47,0 ± 28,6	57,5 ± 26,0	57,2 ± 25,0
PBI (%) ± SA (%)	31,2 ± 29,8	31,9 ± 29,8	32,7 ± 13,8
SB (%) ± SA (%)	48,2 ± 27,6	58,9 ± 31,1	62,1 ± 30,4
ST (mm) ± SA (mm)	3,78 ± 1,21	3,90 ± 1,30	3,87 ± 0,86
AL (mm) ± SA (mm)	4,17 ± 1,82	4,15 ± 1,73	4,09 ± 1,00

6. Diskussion

6.1. Nachweismethode für den Fc γ RIIa-Polymorphismus

Es wurde ein System etabliert, mit dem sich der Fc γ RIIa-Polymorphismus (rs1801274) direkt nachweisen und in die 3 Genotypen einteilen lässt. Durch die Verwendung allelspezifischer Primer bei der PCR zum Nachweis beider Allotypen war es möglich, die Ergebnisse direkt nach der Gelelektrophorese abzulesen und eine Genotypisierung vorzunehmen. Weitere Analysemethoden, wie sie bei anderen Systemen (Carlsson et al. 1998; Osborne et al. 1994; Reilly et al. 1994) nötig sind, um zwischen den Genotypen zu unterscheiden, entfielen dadurch.

Flesch et al. (1998) benutzten erstmals allelspezifische Primer zum Nachweis des 131R und 131H Allotyps. Bei der allelspezifischen PCR wird der Basenaustausch genutzt, um unterschiedliche Primer zu konstruieren, deren 3' Ende jeweils die definierende Base enthält. Weist die zu untersuchende DNA nicht die komplementäre Base auf, so kommt es zu keiner Elongation der Primer-DNA. Der Fc γ RII besitzt mehrere Isoformen (Fc γ RIIa, Fc γ RIIb1, Fc γ RIIb2, Fc γ RIIb3 und Fc γ RIIc), die hinsichtlich ihrer Sequenz sehr ähnlich sind (Warmerdam et al. 1993). Der Polymorphismus ist jedoch nur auf dem Fc γ RIIa lokalisiert, die anderen Isoformen haben an der entsprechenden Stelle als Base ein G wie auch der Fc γ RIIa-131R. Der Nukleotidaustausch befindet sich in der extrazellulären Domäne D₂ (Exon 4) (Warmerdam et al. 1990). Zwischen der extrazellulären Domäne D₂ und dem Transmembran-Exon T_m befindet sich ein Intron, welches Sequenzen enthält, die den Fc γ RIIa von den Fc γ -Rezeptoren IIb und IIc unterscheidet (Reilly et al. 1994). Dies ist für die Konstruktion der Primer von zentraler Bedeutung.

Für unser System diente die Arbeit von Flesch et al. (1998) als Grundlage. Es wurden dieselben Primer benutzt wie dort beschrieben.

Die beiden allelspezifischen Senseprimer 131R und 131H unterscheiden sich dabei nur in einer Base, ebenso wie es bei den beiden polymorphen Formen des Polymorphismus der Fall ist. Als Antisenseprimer diente derselbe wie er von Reilly et al. (1994) verwendet wurde. Dieser Antisenseprimer stammt aus einer Region des

downstream-Introns, in der sich die Sequenzen für FcγRIIa, FcγRIIb und FcγRIIc, wie oben beschrieben, unterscheiden. Der nicht allelspezifische Senseprimer bei Reilly et al. (1994) setzt 34 Nukleotide upstream (in 5' Richtung) vor unserem allelspezifischen Senseprimer an. Es wird dabei ein 287bp-Fragment amplifiziert.

Mit den beiden allelspezifischen Primern 131R und 131H und dem Antisenseprimer von Reilly et al. (1994) war also ein 253bp-Fragment zu erwarten.

Dass es sich bei der PCR mit allelspezifischen Primern zum Nachweis des FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) um ein sicheres und verlässliches Verfahren handelt, zeigten Flesch et al. (1998), indem sie 12 DNA-Proben in ein anderes Labor schickten, um dort diese Proben anhand der Methode von Osborne et al. (1994) untersuchen zu lassen. Die Ergebnisse beider Untersuchungen waren identisch.

Desweiteren entsprachen die FcγRIIa-Genotypen von 28 getesteten Personen in allen Punkten den funktionellen Phänotypen, die man mit einer Immun-Phagozytose-Untersuchung von Monozyten (Schnackenberg et al. 1997) erhalten hatte.

Auch die extern durch die Firma Agowa GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführte Sequenzierung von zwei Stichproben (131R und 131H) dieser Arbeit bestätigt die Sicherheit dieses Verfahrens mit allelspezifischen Primern. Für beide Proben konnte an der Stelle des Polymorphismus A→G die entsprechende Base (A bei 131H und G bei 131R) im Chromatogramm gefunden werden.

Osborne et al. (1994) beschreiben eine Methode zum Nachweis des FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) mit allelspezifischen Oligonukleotidsonden.

Deren Senseprimer P63 unterscheidet nicht zwischen FcγRIIa, FcγRIIb und FcγRIIc. Allerdings enthält der Antisenseprimer P52 9 Basen am 3' Ende des Primers, die einzigartig für FcγRIIa sind. Auch Carlsson et al. (1998) benutzen diese Primer für den ersten Schritt ihrer Nachweismethode.

Die allelspezifischen Oligonukleotidsonden ASO-494G (131R-spezifisch) und ASO-494A (131H-spezifisch) von Osborne et al. (1994) unterscheiden sich in nur einem Nukleotid, genau wie unsere allelspezifischen Primer.

Das durch PCR mit dem Primerpaar P63/P52 erhaltene PCR-Produkt wurde einer Southern-blot Analyse zugeführt. Die Hybridisierung der blots erfolgte dann mit den allelspezifischen Oligonukleotidsonden (ASO).

Von Carlsson et al. (1998) wurde eine verschachtelte PCR mit sequenzspezifischen Primern (nested SSP-PCR) entwickelt, um die Genotypen des FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) nachzuweisen. Dafür wird nach einer ersten PCR-Amplifikation mit dem Primerpaar P52 und P63 das erhaltene PCR-Produkt mit den sequenzspezifischen Senseprimern P5G (131R-spezifisch) und P3A (131H-spezifisch) sowie dem Antisenseprimer P13 reamplifiziert und nach einer Gelelektrophorese analysiert.

Auch van Schie & Wilson (2000) verwenden diese Methode, um zwischen FcγRIIa-131R und FcγRIIa-131H zu unterscheiden. Sie beschreiben in ihrer Arbeit eine Methode, um den Polymorphismus anhand der aus dem Speichel isolierten DNA nachzuweisen. Laut der Autoren soll diese Methode einfacher und für den Patienten angenehmer sein. In allen anderen genannten Studien wurde aus dem Blut isolierte DNA verwendet.

Reilly et al. (1994) beschreiben eine SSCP-Untersuchung im Anschluss an die PCR. Nach deren Aussage sind alle 3 Genotypen des FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) an deren eindeutigem SSCP-Muster zu erkennen.

Alle oben genannten Nachweismethoden haben sich in den letzten Jahren bewährt und sind in vielen Studien, die sich mit diesem FcγRIIa-Polymorphismus beschäftigen, angewendet worden (Chung et al. 2003; Colombo et al. 1998; Loos et al. 2003; Platonov et al. 1998; Tse et al. 1999; van Schie & Wilson 2000).

Die vorgestellten Methoden unterscheiden sich in einigen Punkten voneinander, haben aber eines gemeinsam: Es ist nicht möglich, unmittelbar nach PCR und Gelelektrophorese direkt eine Genotypisierung in die 3 FcγRIIa-Genotypen vorzunehmen. Bei allen Systemen muss das PCR-Produkt weiterverarbeitet werden, um die Genotypen bestimmen zu können.

Bei der Verwendung von allelspezifischen Primern sind die Ergebnisse unmittelbar nach PCR und Gelelektrophorese direkt nach Sichtbarmachen der Banden unter UV-Licht ablesbar. Somit entfallen weitere Analyseverfahren wie Southern blot (Osborne et al. 1994), SSCP (Reilly et al. 1994) oder SSP (Carlsson et al. 1998).

Das Verfahren ist damit eindeutig schneller und leichter zu handhaben als andere schon vorgestellte Methoden.

Die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsreihen bei der Entwicklung der Nachweismethode zeigen deutlich, dass es bei Verwendung der Taq DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) für die PCR in Verbindung mit den allelspezifischen Primern 131R und 131H in keinem der Reaktionsansätze zu einer Amplifizierung der DNA kam. Nach der Gelelektrophorese waren keine spezifischen Banden zu sehen.

Bei Verwendung der HotStarTaq™ Polymerase (Qiagen, Hilden) gelang es recht schnell, nach einigen Testläufen spezifische Produkte zu erhalten.

Dies könnte eindeutig an der verwendeten Polymerase und der damit verbundenen PCR-Technik, der Hotstart-PCR, liegen. Die Hotstart-PCR ist spezifischer und effektiver als die Standard-PCR (Chou et al. 1992). Die Vorzüge des Heißstarts werden besonders deutlich, wenn man nur wenige Zielmoleküle amplifiziert. Auch bei anderen PCR-Verfahren, wie zum Beispiel der Multiplex-PCR, erhöht diese PCR-Technik die Effektivität (Newton & Graham 1997).

Bei der HotStarTaq™-Polymerase handelt es sich um eine gentechnisch hergestellte hitzestabile DNA-Polymerase von 94 kDa. Die HotStarTaq™-Polymerase sorgt für eine hohe Spezifität der PCR und führt häufig zu einer Zunahme der Menge des PCR-Produktes (Qiagen 1999). Durch die teilweise oder vollständige Aktivierung der Polymerase vor der PCR bzw. die Aktivierung schrittweise während der PCR vermeidet man Primerfehler bei Amplikons und Primeroligomeren und erhält eine höhere Ausbeute an spezifischen Produkten (Newton & Graham 1997).

Durch die Entscheidung, den Antisenseprimer so auszuwählen, dass er innerhalb des downstream-Introns zwischen der 2. extrazellulären Domäne D₂ und dem Transmembran-Exon T_m liegt, war es möglich, selektiv FcγRIIa-spezifische PCR-Produkte zu amplifizieren. Eine Amplifizierung von FcγRIIb- und FcγRIIc-spezifischen Produkten konnte dadurch ausgeschlossen werden. Diese Aussage wird von Flesch et al. (1998) bekräftigt. Der Grund hierfür ist, dass dieses o.g. Intron spezielle Sequenzen enthält, die zwischen diesen 3 Rezeptoren unterscheiden (Reilly et al. 1994).

Nach der Formel von Itakura et al. (1984) lässt sich die ungefähre Schmelztemperatur eines Primers, der weniger als 20 Basen besitzt, wie folgt berechnen:

$$T = (\text{Anzahl von G+C}) \times 4^{\circ}\text{C} + (\text{Anzahl von A+T}) \times 2^{\circ}\text{C}.$$

Für die von uns verwendeten Primer ergeben sich somit ungefähre Schmelzpunkte von 52°C für 131R, 54°C für 131H und 56°C für 131R/131H rev. Daraus errechnet sich eine durchschnittliche Temperatur von 54°C.

Die Angaben darüber, wie sich die Annealingtemperatur zur Schmelztemperatur verhalten soll, differieren in der Literatur. So liegen nach Newton & Graham (1997) die idealen Temperaturen etwa 3-12°C über der errechneten Schmelztemperatur.

Gassen et al. (1994) empfehlen eine Annealingtemperatur 5°C unter dem Schmelzpunkt. In den PCR-Programmen für eine PCR mit allelspezifischen Primern wird beispielsweise von Skogen et al. (1994) eine Annealingtemperatur gewählt, die 2-7°C über der durchschnittlichen Schmelztemperatur der allelspezifischen Senseprimer 1 und 2 und des Antisenseprimers liegt.

Für dieses System hat sich für beide Allotypen die Kombination aus 10 Zyklen mit 57°C und anschließenden 22 Zyklen mit 54°C als günstig erwiesen. Mit den Zyklen bei 54°C war eine hohe Ausbeute zu erzielen, wohingegen die 10 Zyklen bei 57°C die Spezifität erhöhten.

6.2. FcγRIIa-Genotypverteilung und Allelhäufigkeit

In dieser Arbeit wurden von insgesamt 96 Personen, alle Mitteleuropäer, die FcγRIIa-Genotypen und die Allelhäufigkeit bestimmt. 46 Personen konnten anhand der Einschlusskriterien als Probanden und 50 als AP-Patienten identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit waren die Genotypen der Gesamtpopulation wie folgt verteilt: 58,3% 131R/131H, 26,1% 131H/131H und 15,6% 131R/131R. Diese Ergebnisse unterscheiden sich teilweise von den Ergebnissen anderer Untersuchungen mitteleuropäischer Populationen. Botto et al. (1996), Osborne et al. (1994), Reilly et al. (1994) und van Schie & Wilson (2000) sprechen in ihren Arbeiten von Werten zwischen 42,4-51% für 131R/131H, 22-30% für 131H/131H und 19-33% für 131R/131R. Die Werte für 131R/131H und 131R/131R weichen hier deutlich von denen der anderen Studien ab. Insbesondere ist der Genotyp 131R/131H deutlich überrepräsentiert. Die Studienpopulationen bei Botto et al. (1996) und van Schie & Wilson (2000) waren mit n=259 bzw. n=271 erheblich größer, die von Osborne et al. (1994) und Reilly et al. (1994) mit n=35 und n=47 kleiner als in der hier vorliegenden Arbeit.

Der große Anteil heterozygoter sowie der geringe Anteil 131R-homozygoter Individuen im Gegensatz zu den Ergebnissen der anderen Arbeiten lässt sich daher nicht ausschließlich mit der Größe der Studienpopulation und der damit verbundenen unterschiedlichen statistischen Aussagekraft erklären. Dieser Unterschied könnte sich aber damit erklären lassen, dass es auch innerhalb gleicher ethnischer Gruppen einige Parameter gibt, die durchaus solch unterschiedliche Daten verursachen könnten. So könnte der Anteil an männlichen und weiblichen Individuen an der Gesamtpopulation eine Rolle spielen. Es gibt Studien, die belegen, dass das Geschlecht innerhalb gleicher ethnischer Gruppen von Bedeutung sein kann.

In den USA wurde in einer Studie nachgewiesen, dass Männer afroamerikanischer Herkunft 2,9 mal häufiger an einer lokalisierten AP erkranken als Frauen gleicher ethnischer Abstammung. Bei weißen Frauen und Männern kam die Erkrankung gleich häufig vor (Loe & Brown 1991). In der vorliegenden Studie erfolgte jedoch keine geschlechtsspezifische Einteilung der Teilnehmer.

Interessanterweise ähneln die hier erlangten Ergebnisse für die Genotypverteilung denen bei Populationen japanischer Abstammung. Osborne et al. (1994) bestimmten in ihrer Arbeit neben einer europäischen auch die Genotypen einer japanischen Population (n=18). 61% wiesen den 131R/131H, 33% den 131H/131H und 6% den 131R/131R-Genotyp auf. Auffällig ist hier der geringe Anteil an Individuen mit dem 131R/131R-Genotyp und der hohe Anteil heterozygoter Individuen. Ähnliche Resultate erhielten auch Rascu et al. (1997) und Kobayashi et al. (1997) bei der Genotypisierung japanischer Individuen.

Die Genotypverteilung und Allelhäufigkeit genetischer Polymorphismen unterscheidet sich oft innerhalb unterschiedlicher ethnischer Gruppen (van der Pol & van de Winkel 1998). Dies belegen auch die Unterschiede zwischen den hier vorgestellten Arbeiten. Von van Schie & Wilson (2000) wurden die Ergebnisse einer mitteleuropäischen Population mit denen einer afroamerikanischen Population verglichen.

Für den FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) konnten sie allerdings keinen signifikanten Unterschied bei der Genotypverteilung zwischen den beiden Populationen feststellen.

In beiden Gruppen kam der 131R/131R-Genotyp häufiger vor als der 131H/131H-Genotyp. Dies widerspricht den Ergebnissen der hier vorgestellten Untersuchung, bei der 131R/131R deutlich unterrepräsentiert ist.

Aussagen zum Vergleich verschiedener ethnischer Gruppen können anhand der vorliegenden Studie jedoch nicht gemacht werden, da die Auswahl der Studienteilnehmer nicht dahingehend erfolgte.

Die Allelhäufigkeit der beiden Allele 131H und 131R in der vorliegenden Arbeit deckt sich mit den Aussagen von Reilly et al. (1994). Die Häufigkeit beider Allele beträgt allerdings auch bei den anderen oben genannten Studien mit Personen europäischer Herkunft immer annähernd 1:1, wobei 131H tendenziell häufiger vorkommt.

Monozyten und Neutrophile von 131H-homozygoten Individuen töten IgG₂ opsonierte Bakterien weitaus effizienter ab als dies bei 131R-homozygoten Individuen der Fall ist (Sanders et al. 1995; van der Pol & van de Winkel 1998; Wilson et al. 1995; Wilson & Kalmar 1996). Der FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) scheint deshalb besonders

dort einen Einfluss auf verschiedene bakterielle Infektionen zu haben, wo IgG₂ eine wichtige protektive Rolle spielt (van de Winkel & Capel 1993).

Deshalb beziehen sich die meisten Ergebnisse aus Studien zu diesem FcγRIIa-Polymorphismus auf bakteriell ausgelöste entzündliche Erkrankungen.

Für Infektionen, die durch Meningokokken verursacht werden, sowie rezidivierende bakterielle Infektionen der Atemwege ist ein Zusammenhang schon nachgewiesen worden (Platonov et al. 1998; Sanders et al. 1994). Auch bei einigen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise dem systemischen Lupus erythematoses (SLE), könnte FcγRIIa ein bestimmender Faktor für die Anfälligkeit einer solchen Erkrankung darstellen (Blasini et al. 1993; Botto et al. 1996; Yee et al. 1997).

Das Wissen um die Einflüsse bekannter Polymorphismen auf bestimmte systemische Erkrankungen dient als viel versprechende Grundlage für die Erforschung genetischer Einflüsse in der Parodontologie. So konnte für das Interleukin-1-Gen ein Polymorphismus nachgewiesen werden, der mit einer chronischen Parodontitis assoziiert werden kann (Kornman et al. 1997a). Für die AP wurden von Michel et al. (2001) ein IL4-Promotor- und Intronpolymorphismus nachgewiesen. Kein Proband der Kontrollgruppe jedoch 27,8% der AP-Patienten wiesen diesen Polymorphismus auf.

Wilson & Kalmar (1996) stellten die Hypothese auf, dass Individuen, die den 131R/131R-Genotyp besitzen, weitaus anfälliger für eine AP sind als andere. Sie führen dies darauf zurück, dass diese Individuen das durch IgG₂ opsonierte Bakterium *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, einem Schlüsselpathogen der AP, wesentlich schlechter phagozytieren können als andere.

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchung bestätigen diese Vermutung für die hier untersuchte Population. Bei 12 AP-Patienten (24%) konnte der 131R/131R-Genotyp nachgewiesen werden, wohingegen nur 3 Probanden (6,5%) diesen Genotyp besaßen. Diese 3 Probanden waren zum Zeitpunkt der klinischen und radiologischen Untersuchung zwar als parodontal gesund klassifiziert worden, können aber aufgrund ihres noch jungen Alters (22,24 und 25 Jahre) in den nächsten Jahren durchaus noch an einer AP erkranken. Wäre dies der Fall, so würde das die Ergebnisse dieser Untersuchung noch weiter untermauern. Auf jeden Fall sollten diese 3 Probanden in den nächsten Jahren in regelmäßigen Abständen klinisch und radiologisch nachuntersucht werden.

56% der Patienten waren heterozygot (131R/131H) und 20% 131H-homozygot (131H/131H). Bei den Probanden waren 60,9% heterozygot und 15 Probanden (32,6%) 131H-homozygot.

Diese Verteilung der Genotypen zeigt zum einen, dass der 131R/131R-Genotyp für die AP von Bedeutung zu sein scheint. Zum anderen wird deutlich, dass das 131R-Allel alleine dabei offensichtlich keine Rolle spielt. Dies zeigt sich daran, dass 67,4% aller Probanden heterozygot oder 131R-homozygot waren und somit auch Träger des 131R-Allels sind. Wilson & Kalmar (1996) waren der Meinung, dass auch dem 131R-Allel alleine eine Bedeutung für die AP-Anfälligkeit zukommt. Nach deren Aussage haben auch heterozygote Individuen aufgrund des Vorhandenseins des 131R-Allels ein erhöhtes Risiko, an einer AP zu erkranken. Zwar sei dieses Risiko nicht so hoch wie bei 131R-homozygoten Individuen, aber dennoch vorhanden. Diese Behauptung kann durch die hier vorgestellten Ergebnisse, aber auch durch die Ergebnisse anderer Publikationen widerlegt werden.

Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Studie konnten die Untersuchungen von Kobayashi et al. (1997b; 2000a; 2001), Colombo et al. (1998) oder Meisel et al. (2001) die Hypothese von Wilson & Kalmar (1996), dass der 131R/131R-Genotyp einen Risikofaktor für die AP darstellt, nicht als richtig belegen.

Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass sich die Auswahl der Patienten in allen genannten Studien von der hier vorgenommenen Auswahl unterscheidet.

Kobayashi et al. (1997b; 2000a; 2001) führten ihre Untersuchungen ausschließlich an Japanern durch. Neben der unterschiedlichen ethnischen Gruppe unterscheiden sich deren Untersuchungen auch noch darin, dass entweder Patienten mit einer chronischen Parodontitis oder mit einer generalisierten AP mit parodontal gesunden Probanden verglichen wurden. Keine ihrer Studien beschäftigt sich ausschließlich mit der AP allgemein oder aber mit der lokalisierten Form.

Meisel et al. (2001) untersuchten 145 Parodontitispatienten hinsichtlich ihrer FcγRIIa-, FcγRIIIa-, und FcγRIIIb-Genotypen. Auch sie konnten keine Verbindung zwischen dem FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) und der Parodontitis bestätigen. Sie führten ihre Studie zwar an europäischen Individuen durch, klassifizierten diese aber nicht nach verschiedenen Parodontitisformen. Es wurde keine genaue Einteilung der Parodontitispatienten vorgenommen.

Colombo et al. (1998) verglichen in ihrer Untersuchung die IgG₂-Level im Serum, die Häufigkeit von Gm(23)-negativem Allotyp sowie die Häufigkeit von FcγRIIa- und FcγRIIIb-Genotypen bei 32 refraktären Parodontitisfällen, 54 erfolgreich behandelten Patienten und 27 gesunden Personen. Alle Personen waren europäischer Herkunft.

Bei den 3 klinischen Gruppen kamen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der untersuchten FcγR-Genotypen vor. IgG₂-Spiegel, Gm(23)-Allotyp, FcγRIIa- und FcγRIIIb-Genotypen und die Menge des Tabakkonsums waren mit dem klinischen Befund nur schwach oder gar nicht assoziiert.

Die refraktäre Parodontitis existiert nach der neuen Klassifikation der Parodontalerkrankungen nicht mehr als eigene Kategorie (Armitage 1999). Daher kann es sich bei den hier untersuchten Fällen sowohl um Patienten mit chronischer als auch um Patienten mit aggressiver Parodontitis handeln. Da es äußerst unwahrscheinlich ist, dass Patienten nur aufgrund einer erfolgreich durchgeführten Parodontalbehandlung ihr genetisches Muster verändern, macht der Vergleich der Genotypen zwischen den beiden Gruppen an Patienten aus heutiger Sicht wenig Sinn.

Im Gegensatz zu den erwähnten Studien, welche die Hypothese von Wilson & Kalmar (1996) lediglich nicht stützen können, behaupten Loos et al. (2003) aufgrund ihrer Ergebnisse exakt das Gegenteil. Sie verglichen die FcγRIIa-, FcγRIIIa- und FcγRIIIb-Genotypen von 68 Parodontitispatienten mit denen von 61 gesunden Probanden. Bei 12 Patienten wurde eine AP, bei 56 eine CP diagnostiziert. Beim Vergleich aller Patienten mit der Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede für FcγRIIa festgestellt werden. Jedoch wiesen von den AP-Patienten 58% den 131H/131H-Genotyp auf, bei der Kontrollgruppe waren es lediglich 25%. Damit ist in dieser Studie der 131H/131H-Genotyp bei den AP-Patienten deutlich überrepräsentiert. Aufgrund dieser Ergebnisse stellten sie die Vermutung auf, dass nicht der 131R/131R-Genotyp mit der AP assoziiert ist, sondern der 131H/131H-Genotyp. Sie versuchen dies mit einer ähnlichen biologischen Erklärung zu begründen wie Wilson & Kalmar (1996). Aufgrund der äußerst effizienten Bindung von IgG₂ an den neutrophilen Rezeptor bei 131H-homozygoten Individuen wird vermutet, dass diese Neutrophilen dadurch hyperaktiv werden. Eine solche Hyperaktivität von Neutrophilen wurde bei der Parodontitis schon beobachtet (Gustafsson & Asman 1996; Kimura et al. 1993). Durch diese hyperaktiven Neutrophilen werden mehr gewebszerstörende Moleküle wie

lysosomale Enzyme oder Matrixmetalloproteinasen freigesetzt als es durch andere Neutrophile der Fall ist, die aufgrund einer weniger effizienten Bindung von IgG₂ deutlich inaktiver sind. Die von Loos et al. (2003) vermutete Rolle, die der 131H/131H-Genotyp für die Pathogenese der AP zu spielen scheint, wurde auch schon für die heparin-induzierte Trombozytopenie (HIT) und das Guillain-Barré-Syndrom beobachtet (Carlsson et al. 1998; van der Pol et al. 2000). Auch hierfür wurde als Erklärung für diese Beobachtungen eine ähnliche Hypothese vorgeschlagen wie die oben erwähnte.

Da in der Arbeit von Loos et al. (2003) lediglich 12 AP-Patienten untersucht wurden, sollte man aufgrund der geringen n-Zahl die Aussagekraft dieser Ergebnisse nicht zu hoch einschätzen.

Yamamoto et al. (2004) und Nicu et al. (2007) kommen in ihren Arbeiten zu ähnlichen Ergebnissen wie Loos et al. (2003). Auch sie halten den 131H/131H Genotyp in Verbindung mit der Pathogenese der Parodontitis für wichtiger. Yamamoto et al. (2004) fanden heraus, dass bei rauchenden Patienten mit chronischer Parodontitis der 131H/131H Genotyp mit 35,1% im Vergleich mit der Kontrollgruppe (19%) deutlich überrepräsentiert war. Sie vermuten daher ein deutlich erhöhtes Risiko für Raucher, die den 131H/131H Genotyp besitzen, an einer chronischen Parodontitis zu erkranken.

Nicu et al. (2007) konnten in einer Studie mit 98 Parodontitispatienten feststellen, dass die Patienten, die den 131H/131H Genotyp besaßen, einen größeren Knochenverlust und mehr Knochenabbau aufwiesen als diejenigen mit dem 131R/131H bzw. 131R/131R Genotyp und halten deshalb diesen Genotyp für die Parodontitis für deutlich gefährlicher. Beide Arbeitsgruppen beziehen sich jedoch nur auf die chronische Parodontitis bzw. die Parodontitis im allgemeinen und nicht speziell auf die aggressive Form. Da beide Parodontitisformen in Verlauf, Schweregrad, Ätiologie und Pathogenese Unterschiede aufweisen, können sich durchaus auch Unterschiede bezüglich der Genetik ergeben. Deshalb sollten solche Studien auch immer separat für die chronische und die aggressive Form durchgeführt werden.

Dass es sich bei der Parodontitis um eine multifaktoriell bedingte Krankheit handelt, bei der unter anderem auch genetische Faktoren eine wichtige Rolle spielen, ist allgemein bekannt und wurde schon mehrfach in dieser Arbeit erwähnt. Allerdings existiert kein bestimmtes „Parodontitis-Gen“, weshalb hierbei von einer polygenen Erkrankung gesprochen werden muss. Das heißt, man kann diese Erkrankung nicht auf ein ganz bestimmtes Gen zurückführen, wie es bei Erkrankungen mit monogener Ursache wie

zum Beispiel der Hämophilie oder der Mukoviszidose der Fall ist. Innerhalb klinisch gleichartiger Patientengruppen besteht außerdem in einigen polymorphen Genen eine Verschiedenartigkeit, die für die Pathogenese der Parodontitis eine Rolle spielen könnte (Loos & Van der Velden 2002). Daher sind immer weitere Assoziationsstudien nötig, um sämtliche genetischen Einflüsse zu identifizieren.

Solche Assoziationsstudien können allerdings sehr leicht Fehler in der Methodik aufweisen und falsch-positive Ergebnisse produzieren, insbesondere dann, wenn es sich um Untersuchungen mit geringer Probenzahl handelt (Lehrnbecher et al. 1999). Daher sollten sowohl die hier vorgestellten Ergebnisse als auch die Ergebnisse anderer Studien zum Zusammenhang von aggressiver Parodontitis und den FcγRIIa-Genotypen mit größter Vorsicht interpretiert werden.

6.3. Klinische Parameter

Die Ergebnisse für die klinischen Parameter der Probanden und Patienten spiegeln die Einschlusskriterien (s. Kapitel 4.4) wider. Diese deutlichen Unterschiede sind im Ergebnisteil (Kapitel 5.4) grafisch und tabellarisch dargestellt.

Statistische Aussagen hinsichtlich des Zusammenhanges der klinischen Befunde mit den Ergebnissen der Genotypuntersuchungen erübrigen sich, da auch hierbei eindeutig die Einschlusskriterien wiederzufinden sind.

Dass Parodontitispatienten bei allen hier aufgeführten klinischen Parametern deutlich schlechtere Werte aufweisen als parodontal gesunde Menschen, ist allgemein bekannt und muss hier nicht weiter ausgeführt werden. Dieser Sachverhalt ist in zahlreichen Publikationen und Lehrbüchern der letzten Jahrzehnte ausführlich beschrieben.

Aus diesen Gründen erübrigt sich auch die weitere Diskussion dieser Ergebnisse.

6.4. Schlussfolgerungen

Das in dieser Arbeit etablierte Nachweissystem für den FcγRIIa-Polymorphismus (rs1801274) ist deutlich einfacher und schneller als andere Verfahren. Der große Vorteil liegt darin, dass die Genotypisierung unmittelbar nach PCR und Gelelektrophorese vorgenommen werden kann. Weitere Arbeitsschritte, die bei anderen Verfahren nötig sind, um zwischen den Genotypen zu unterscheiden, entfallen durch die Verwendung der allelspezifischen Primer.

Aufgrund der Ergebnisse der Genotypisierung von Probanden und AP-Patienten muss möglicherweise davon ausgegangen werden, dass der FcγRIIa-131R/131R Genotyp mit einer Prädisposition für die AP bei Mitteleuropäern assoziiert werden kann.

Diese Behauptung könnte durch weitere Assoziationsstudien untermauert werden, so dass ein noch größeres Probanden- und Patientenkollektiv zugrundeliegen würde als es hier und in anderen schon publizierten Arbeiten der Fall ist.

Möglicherweise sind außer den schon bekannten auch noch andere Polymorphismen mit in die Pathogenese der AP und anderer Parodontitiden involviert. Deshalb sollten auch dahingehend weitere Studien durchgeführt werden, um die Bedeutung genetischer Einflüsse bei der Entstehung der Parodontitis zu identifizieren.

7. Zusammenfassung/Summary

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der aggressiven Parodontitis und dem Fc γ RIIa-Polymorphismus (rs1801274) innerhalb einer mitteleuropäischen Population nachgewiesen werden. Um diese Untersuchungen reproduzierbar und einfach durchführen zu können, sollte zum Nachweis ein System mit allelspezifischen Primern etabliert werden.

Alle Studienteilnehmer wurden vor Untersuchungsbeginn über das Ziel und den Ablauf der Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Probanden und Patienten wurden nach bestimmten Kriterien ausgewählt und in zwei Gruppen eingeteilt. Von den insgesamt 96 Teilnehmern an der Studie wurden 46 als Probanden und 50 als Patienten mit einer AP klassifiziert. Die Erkrankung war anhand von klinischen und radiologischen Faktoren diagnostiziert worden. Ihnen wurde Blut entnommen und daraus die DNA isoliert. Zur Darstellung der klinischen Situation wurden die Parameter PI, PBI, ST, SB und AL bestimmt. Erwartungsgemäß waren diese Werte bei der Gruppe der Patienten deutlich erhöht und gaben die Einschlusskriterien wieder. Zum Nachweis des Polymorphismus wurde ein System mit allelspezifischen Primern, wie es ähnlich schon von Flesch et al. (1998) beschrieben wurde, gewählt.

In einer Reihe von Vorversuchen wurden verschiedene Polymerasen, Konzentrationsverhältnisse der PCR-Komponenten und PCR-Programme ausgetestet, bis schließlich ein funktionsfähiges System gefunden war. Die beiden Allele 131R und 131H konnten nach PCR und Gelelektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Ergebnisse wurden dann zur Dokumentation fotografiert.

Für dieses System hat sich die Kombination aus HotStarTaq™-Polymerase einschließlich aller mitgelieferten Komponenten in Verbindung mit den allelspezifischen Sense-Primern 131R, 131H und dem entsprechenden Antisense-Primer 131R/131H rev als besonders tauglich erwiesen (modifiziert n. Flesch et al. 1998). Als Positivkontrolle diente das Primerpaar HGH-I/HGH-II (Bein et al. 1992). Es ergaben sich charakteristische Banden bei 253bp für 131R bzw. 131H und bei 439bp für die

Positivkontrolle. Dies wurde durch eine extern durchgeführte Sequenzierung von zufällig ausgewählten PCR-Produkten nochmals verifiziert.

Mit diesem System wurde eine Gruppe AP-Patienten und eine gesunde Kontrollgruppe untersucht. In der Allelhäufigkeit waren keine großen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erkennbar. Jedoch konnten bei der Genotypverteilung eindeutig Unterschiede nachgewiesen werden. Die Genotypen 131R/131H und 131H/131H kamen bei den Probanden zu 60,9% und 32,6%, bei den AP-Patienten zu 56,0% und 20,0% vor. Der für die AP relevante Genotyp 131R/131R war bei den Patienten mit 24,0% gegenüber 6,5% bei den Probanden deutlich überrepräsentiert.

Dies bekräftigt die Aussage von Wilson & Kalmar (1996), die einen Zusammenhang zwischen den polymorphen Formen des FcγRIIa und der AP vermuteten. Deren Vermutung stützt sich auf die Tatsache, dass der 131R-Allotyp IgG₂ als vorherrschende Antikörperklasse bei parodontalen Erkrankungen nicht effizient bindet.

Aufgrund dieser Ergebnisse muss man möglicherweise davon ausgehen, dass der untersuchte Polymorphismus mit einer Prädisposition für die AP assoziiert werden kann.

Es sollten unbedingt weitere Studien mit einer noch größeren Anzahl an Studienteilnehmern durchgeführt werden, um die Bedeutung dieses und anderer FcγRIIa-Polymorphismen für die Ätiologie und Pathogenese der AP besser zu klären.

Summary

The aim of the present study was to determine a possible association between aggressive periodontitis and FcγRIIa-polymorphism (rs1801274) within a Caucasian population from central Europe. To make this investigation simple and reproducible, an assay technique to detect this polymorphism should be established.

At the beginning of this study, all participating persons were informed about the aims and the course of the examination and gave their declaration of consent. All subjects were selected by certain criteria and divided into two groups. Among the 96 participants of the study, 46 of them were classified as control subjects and 50 as patients suffering from aggressive periodontitis. The diagnosis of the disease is based on clinical and radiological parameters. Genomic DNA was isolated from whole blood samples. The clinical situation was described by parameters such as plaque index (PI), gingival index

(PBI), pocket depth (ST), bleeding on probing (SB) and clinical attachment loss (AL). As expected, the clinical parameters of the patients were considerably above those of the control subjects. For the detection of the polymorphism a system with allele-specific primers was used similar to that described by Flesch et al. (1998).

In several preliminary tests diverse polymerases, concentrations of all PCR components and cycle programs were tested in order to find a functional PCR system. After amplification by polymerase chain reaction (PCR) and agarose gel electrophoresis the two alleles 131R and 131H could be shown with help of UV-light. The results of the gel electrophoresis were documented by photographs.

The combination of HotStarTaqTM-polymerase, including the provided buffers and reagents, and the allele-specific senseprimers 131R and 131H as well as the antisenseprimer 131R/131H rev were proved to be very suitable (modified by Flesch et al. 1998). For internal control the primers HGH-I/HGH-II were used (Bein et al. 1992). 131R and 131H resulted in 253bp-fragments, the internal control HGH-I/HGH-II in 439 bp-fragments. A sequencing analysis of random selected PCR products was arranged by an external institute to verify the reliability of the described method.

The system described above was used to determine a group of AP-patients and a healthy control group. No significant differences in allelic frequency but in the distribution of the 3 genotypes were detectable between the two groups. The genotypes 131R/131H and 131H/131H occurred quite similar in both groups (control subjects 60,9% and 32,6%; AP-patients 56% and 20%). The 131R/131R genotype occurred considerably more frequent (24%) in aggressive periodontitis patients and relatively rare (6,5%) in control subjects.

This confirms the statement of Wilson & Kalmar (1996), who suspected the polymorphic forms of Fc γ RIIa to be associated with aggressive periodontitis. This assumption is based on the fact, that 131R is not able to bind IgG₂ efficiently, which is the predominant Ig-subclass in periodontal disease.

Due to the results of this study we have to conclude, that the investigated Fc γ RIIa-polymorphism can be potentially associated with aggressive periodontitis.

Further studies with a larger number of participants should be arranged to resolve the impact of Fc γ RIIa-polymorphisms on the aetiology and pathogenesis of aggressive periodontitis.

8. Literaturverzeichnis

Albandar, J. M., Brown, L. J. & Loe, H. (1997) Clinical features of early-onset periodontitis. *J.Am.Dent.Assoc.*, **128**, 1393-1399.

Albandar, J. M. & Tinoco, E. M. (2002) Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol.2000*, **29**, 153-176.

Altman, L. C., Page, R. C., Vandesteen, G. E., Dixon, L. I. & Bradford, C. (1985) Abnormalities of leukocyte chemotaxis in patients with various forms of periodontitis. *J.Periodontal Res.*, **20**, 553-563.

Alvares, O., Klebe, R., Grant, G. & Cochran, D. L. (1995) Growth factor effects on the expression of collagenase and TIMP-1 in periodontal ligament cells. *J.Periodontol.*, **66**, 552-558.

American Academy of Periodontology AAP (1999) Position paper: tobacco use and the periodontal patient. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. *J.Periodontol.*, **70**, 1419-1427.

ANON (1996) Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann.Periodontol.*, **1**, 926-932.

Arai, H., Nomura, Y., Kinoshita, M., Shimizu, H., Ono, K., Goto, H., Takigawa, M., Nishimura, F., Washio, N., Kurihara, H. & . (1995) Response of human gingival fibroblasts to prostaglandins. *J.Periodontal Res.*, **30**, 303-311.

Arepally, G., McKenzie, S. E., Jiang, X. M., Poncz, M. & Cines, D. B. (1997) Fc gamma RIIA H/R 131 polymorphism, subclass-specific IgG anti-heparin/platelet factor 4 antibodies and clinical course in patients with heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Blood*, **89**, 370-375.

Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann.Periodontol.*, **4**, 1-6.

Armitage, G. C. (2004) Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol.2000*, **34**, 9-21.

Bartold, P. M. (1992) Distribution of chondroitin sulfate and dermatan sulfate in normal and inflamed human gingivae. *J.Dent.Res.*, **71**, 1587-1593.

Bein, G., Glaser, R. & Kirchner, H. (1992) Rapid HLA-DRB1 genotyping by nested PCR amplification. *Tissue Antigens*, **39**, 68-73.

Blasini, A. M., Stekman, I. L., Leon-Ponte, M., Caldera, D. & Rodriguez, M. A. (1993) Increased proportion of responders to a murine anti-CD3 monoclonal antibody of the IgG1 class in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin.Exp.Immunol.*, **94**, 423-428.

Bolin, A., Eklund, G., Frithiof, L. & Lavstedt, S. (1993) The effect of changed smoking habits on marginal alveolar bone loss. A longitudinal study. *Swed.Dent.J.*, **17**, 211-216.

Bostrom, L., Linder, L. E. & Bergstrom, J. (1998) Influence of smoking on the outcome of periodontal surgery. A 5-year follow-up. *J.Clin.Periodontol.*, **25**, 194-201.

Botto, M., Theodoridis, E., Thompson, E. M., Beynon, H. L., Briggs, D., Isenberg, D. A., Walport, M. J. & Davies, K. A. (1996) Fc gamma RIIa polymorphism in systemic lupus erythematosus (SLE): no association with disease. *Clin.Exp.Immunol.*, **104**, 264-268.

Boughman, J. A., Astemborski, J. A. & Suzuki, J. B. (1992) Phenotypic assessment of early onset periodontitis in sibships. *J.Clin.Periodontol.*, **19**, 233-239.

Boughman, J. A., Halloran, S. L., Roulston, D., Schwartz, S., Suzuki, J. B., Weitkamp, L. R., Wenk, R. E., Wooten, R. & Cohen, M. M. (1986) An autosomal-dominant form of juvenile periodontitis: its localization to chromosome 4 and linkage to dentinogenesis imperfecta and Gc. *J.Craniofac.Genet.Dev.Biol.*, **6**, 341-350.

Breivik, T., Thrane, P. S., Murison, R. & Gjermo, P. (1996) Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur.J.Oral Sci.*, **104**, 327-334.

Burmeister, J. A., Best, A. M., Palcanis, K. G., Caine, F. A. & Ranney, R. R. (1984) Localized juvenile periodontitis and generalized severe periodontitis: clinical findings. *J.Clin.Periodontol.*, **11**, 181-192.

Carlsson, L. E., Santoso, S., Baurichter, G., Kroll, H., Papenberg, S., Eichler, P., Westerdaal, N. A., Kiefel, V., van de Winkel, J. G. & Greinacher, A. (1998) Heparin-induced thrombocytopenia: new insights into the impact of the FcγRIIIa-R-H131 polymorphism. *Blood*, **92**, 1526-1531.

Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E., Raymond, J. & Bloch, W. (1992) Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1717-1723.

Christersson, L. A., Albini, B., Zambon, J. J., Wikesjö, U. M. & Genco, R. J. (1987) Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscopic studies. *J.Periodontol.*, **58**, 529-539.

Chung, C. S., Kau, M. C., Chung, S. S. & Rao, D. C. (1977) A genetic and epidemiologic study of periodontal disease in Hawaii. II. Genetic and environmental influence. *Am.J.Hum.Genet.*, **29**, 76-82.

Chung, H. Y., Lu, H. C., Chen, W. L., Lu, C. T., Yang, Y. H. & Tsai, C. C. (2003) Gm (23) allotypes and Fc gamma receptor genotypes as risk factors for various forms of periodontitis. *J.Clin.Periodontol.*, **30**, 954-960.

Cimasoni, G. (1983) Crevicular fluid updated. *Monogr Oral Sci.*, **12**, III-152.

Clark, R. A., Page, R. C. & Wilde, G. (1977) Defective neutrophil chemotaxis in juvenile periodontitis. *Infect.Immun.*, **18**, 694-700.

Coccia, C. T., McDonald, R. E. & Mitchell, D. F. (1966) Papillon-Lefevre syndrome: precocious periodontosis with palmar-plantar hyperkeratosis. *J.Periodontol.*, **37**, 408-414.

Colombo, A. P., Eftimiadi, C., Haffajee, A. D., Cugini, M. A. & Socransky, S. S. (1998) Serum IgG2 level, Gm(23) allotype and FcγRIIa and FcγRIIIb receptors in refractory periodontal disease. *J.Clin.Periodontol.*, **25**, 465-474.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. & James, G. (1994) Biofilms, the customized microniche. *J.Bacteriol.*, **176**, 2137-2142.

da Silva, A. M., Newman, H. N. & Oakley, D. A. (1995) Psychosocial factors in inflammatory periodontal diseases. A review. *J.Clin.Periodontol.*, **22**, 516-526.

Darveau, R. P., Cunningham, M. D., Bailey, T., Seachord, C., Ratcliffe, K., Bainbridge, B., Dietsch, M., Page, R. C. & Aruffo, A. (1995) Ability of bacteria associated with chronic inflammatory disease to stimulate E-selectin expression and promote neutrophil adhesion. *Infect.Immun.*, **63**, 1311-1317.

Darveau, R. P., Tanner, A. & Page, R. C. (1997) The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol.2000*, **14**, 12-32.

Dennison, D. K. & Van Dyke, T. E. (1997) The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol.2000*, **14**, 54-78.

Deutsche Gesellschaft für Parodontologie (2002) *Klassifikation der Parodontalerkrankungen*. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH.

Dibart, S., Eftimiadi, C., Socransky, S., Taubman, M. A. & Van Dyke, T. E. (1998) Rapid evaluation of serum and gingival crevicular fluid immunoglobulin G subclass antibody levels in patients with early-onset periodontitis using checkerboard immunoblotting. *Oral Microbiol.Immunol.*, **13**, 166-172.

Diehl, S. R., Wang, Y., Brooks, C. N., Burmeister, J. A., Califano, J. V., Wang, S. & Schenkein, H. A. (1999) Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *J.Periodontol.*, **70**, 418-430.

DiScipio, R. G., Daffern, P. J., Kawahara, M., Pike, R., Travis, J., Hugli, T. E. & Potempa, J. (1996) Cleavage of human complement component C5 by cysteine proteinases from *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis*. Prior oxidation of C5 augments proteinase digestion of C5. *Immunology*, **87**, 660-667.

Ebersole, J. L. (1990) Systemic humoral immune responses in periodontal disease. *Crit Rev.Oral Biol.Med.*, **1**, 283-331.

Ebersole, J. L., Cappelli, D. & Sandoval, M. N. (1994) Subgingival distribution of *A. actinomycetemcomitans* in periodontitis. *J.Clin.Periodontol.*, **21**, 65-75.

Ebersole, J. L., Taubman, M. A., Smith, D. J. & Goodson, J. M. (1984) Gingival crevicular fluid antibody to oral microorganisms. I. Method of collection and analysis of antibody. *J.Periodontal Res.*, **19**, 124-132.

Ebersole, J. L., Taubman, M. A., Smith, D. J. & Socransky, S. S. (1982) Humoral immune responses and diagnosis of human periodontal disease. *J.Periodontal Res.*, **17**, 478-480.

Emrich, L. J., Shlossman, M. & Genco, R. J. (1991) Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Periodontol.*, **62**, 123-131.

Endo, M., Tai, H., Tabeta, K., Kobayashi, T., Yamazaki, K. & Yoshie, H. (2001) Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in Japanese patients with early-onset periodontitis. *J.Periodontol.*, **72**, 1554-1559.

Firatli, E. (1997) The relationship between clinical periodontal status and insulin-dependent diabetes mellitus. Results after 5 years. *J.Periodontol.*, **68**, 136-140.

Flesch, B. K., Bauer, F. & Neppert, J. (1998) Rapid typing of the human Fc gamma receptor IIA polymorphism by polymerase chain reaction amplification with allele-specific primers. *Transfusion*, **38**, 174-176.

Galbraith, G. M., Steed, R. B., Sanders, J. J. & Pandey, J. P. (1998) Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *J.Periodontol.*, **69**, 428-433.

Gassen, H. G., Sachse, G. E. & Schulte, A. (1994) *PCR*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Gemmell, E., Marshall, R. I. & Seymour, G. J. (1997) Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol.2000*, **14**, 112-143.

Genco, R. J., Ho, A. W., Grossi, S. G., Dunford, R. G. & Tedesco, L. A. (1999) Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J.Periodontol.*, **70**, 711-723.

Glavind, L., Lund, B. & Loe, H. (1968) The relationship between periodontal state and diabetes duration, insulin dosage and retinal changes. *J.Periodontol.*, **39**, 341-347.

Grenier, D. (1992) Inactivation of human serum bactericidal activity by a trypsinlike protease isolated from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect.Immun.*, **60**, 1854-1857.

- Grenier, D. & Michaud, J. (1993) Evidence for the absence of hyaluronidase activity in *Porphyromonas gingivalis*. *J.Clin.Microbiol.*, **31**, 1913-1915.
- Grossi, S. G., Skrepcinski, F. B., DeCaro, T., Zambon, J. J., Cummins, D. & Genco, R. J. (1996) Response to periodontal therapy in diabetics and smokers. *J.Periodontol.*, **67**, 1094-1102.
- Gustafsson, A. & Asman, B. (1996) Increased release of free oxygen radicals from peripheral neutrophils in adult periodontitis after Fc delta-receptor stimulation. *J.Clin.Periodontol.*, **23**, 38-44.
- Gwinn, M. R., Sharma, A. & De Nardin, E. (1999) Single nucleotide polymorphisms of the N-formyl peptide receptor in localized juvenile periodontitis. *J.Periodontol.*, **70**, 1194-1201.
- Haber, J., Wattles, J., Crowley, M., Mandell, R., Joshipura, K. & Kent, R. L. (1993) Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J.Periodontol.*, **64**, 16-23.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol.2000*, **5**, 78-111.
- Hammond, B. F., Lillard, S. E. & Stevens, R. H. (1987) A bacteriocin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect.Immun.*, **55**, 686-691.
- Hardie, J. M. (1992) Oral microbiology: current concepts in the microbiology of dental caries and periodontal disease. *Br.Dent.J.*, **172**, 271-278.
- Hart, T. C. & Kornman, K. S. (1997) Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol.2000*, **14**, 202-215.

Hart, T. C., Marazita, M. L., McCanna, K. M., Schenkein, H. A. & Diehl, S. R. (1993) Reevaluation of the chromosome 4q candidate region for early onset periodontitis. *Hum.Genet.*, **91**, 416-422.

Hassell, T. M. & Harris, E. L. (1995) Genetic influences in caries and periodontal diseases. *Crit Rev.Oral Biol.Med.*, **6**, 319-342.

Helgeland, K. & Nordby, O. (1993) Cell cycle-specific growth inhibitory effect on human gingival fibroblasts of a toxin isolated from the culture medium of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J.Periodontal Res.*, **28**, 161-165.

Hennig, B. J., Parkhill, J. M., Chapple, I. L., Heasman, P. A. & Taylor, J. J. (1999) Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases. *J.Periodontol.*, **70**, 1032-1038.

Hodge, P. J., Riggio, M. P. & Kinane, D. F. (2001) Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalised early onset periodontitis. *J.Clin.Periodontol.*, **28**, 430-436.

Holt, S. C. & Bramanti, T. E. (1991) Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit Rev.Oral Biol.Med.*, **2**, 177-281.

Holt, S. C., Kesavalu, L., Walker, S. & Genco, C. A. (1999) Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol.2000*, **20**, 168-238.

Itakura, K., Rossi, J. J. & Wallace, R. B. (1984) Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Annu.Rev.Biochem.*, **53**, 323-356.

Jorgenson, R. J., Levin, L. S., Hutcherson, S. T. & Salinas, C. F. (1975) Periodontosis in sibs. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.*, **39**, 396-402.

- Kalmar, J. R. (1994) Measurement of opsonic phagocytosis by human polymorphonuclear neutrophils. *Methods Enzymol.*, **236**, 108-119.
- Kilian, M., Ellegaard, B. & Mestecky, J. (1989) Distribution of immunoglobulin isotypes including IgA subclasses in adult, juvenile, and rapidly progressive periodontitis. *J.Clin.Periodontol.*, **16**, 179-184.
- Kimura, S., Yonemura, T., Hiraga, T. & Okada, H. (1992) Flow cytometric evaluation of phagocytosis by peripheral blood polymorphonuclear leucocytes in human periodontal diseases. *Arch.Oral Biol.*, **37**, 495-501.
- Kimura, S., Yonemura, T. & Kaya, H. (1993) Increased oxidative product formation by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes in human periodontal diseases. *J.Periodontal Res.*, **28**, 197-203.
- Kinane, D. F., Podmore, M., Murray, M. C., Hodge, P. J. & Ebersole, J. (2001) Etiopathogenesis of periodontitis in children and adolescents. *Periodontol.2000*, **26**, 54-91.
- Kobayashi, T., Sugita, N., van der Pol, W. L., Nunokawa, Y., Westerdaal, N. A., Yamamoto, K., van de Winkel, J. G. & Yoshie, H. (2000a) The Fcgamma receptor genotype as a risk factor for generalized early-onset periodontitis in Japanese patients. *J.Periodontol.*, **71**, 1425-1432.
- Kobayashi, T., Westerdaal, N. A., Miyazaki, A., van der Pol, W. L., Suzuki, T., Yoshie, H., van de Winkel, J. G. & Hara, K. (1997b) Relevance of immunoglobulin G Fc receptor polymorphism to recurrence of adult periodontitis in Japanese patients. *Infect.Immun.*, **65**, 3556-3560.
- Kobayashi, T., Yamamoto, K., Sugita, N., van der Pol, W. L., Yasuda, K., Kaneko, S., van de Winkel, J. G. & Yoshie, H. (2001) The Fc gamma receptor genotype as a severity factor for chronic periodontitis in Japanese patients. *J.Periodontol.*, **72**, 1324-1331.

Kornman, K. S., Crane, A., Wang, H. Y., di Giovine, F. S., Newman, M. G., Pirk, F. W., Wilson, T. G., Jr., Higginbottom, F. L. & Duff, G. W. (1997a) The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J.Clin.Periodontol.*, **24**, 72-77.

Kornman, K. S., Page, R. C. & Tonetti, M. S. (1997b) The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol.2000*, **14**, 33-53.

Kornman, K. S. & Robertson, P. B. (1985) Clinical and microbiological evaluation of therapy for juvenile periodontitis. *J.Periodontol.*, **56**, 443-446.

Krall, E. A., Garcia, R. I. & Dawson-Hughes, B. (1996) Increased risk of tooth loss is related to bone loss at the whole body, hip, and spine. *Calcif.Tissue Int.*, **59**, 433-437.

Kribbs, P. J. (1990) Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. *J.Prosthet.Dent.*, **63**, 218-222.

Kribbs, P. J., Chesnut, C. H., III, Ott, S. M. & Kilcoyne, R. F. (1989) Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. *J.Prosthet.Dent.*, **62**, 703-707.

Kribbs, P. J., Chesnut, C. H., III, Ott, S. M. & Kilcoyne, R. F. (1990) Relationships between mandibular and skeletal bone in a population of normal women. *J.Prosthet.Dent.*, **63**, 86-89.

Kribbs, P. J., Smith, D. E. & Chesnut, C. H., III (1983) Oral findings in osteoporosis. Part II: Relationship between residual ridge and alveolar bone resorption and generalized skeletal osteopenia. *J.Prosthet.Dent.*, **50**, 719-724.

Kuramitsu, H. K., Yoneda, M. & Madden, T. (1995) Proteases and collagenases of *Porphyromonas gingivalis*. *Adv.Dent.Res.*, **9**, 37-40.

Lang, N., Bartold, P. M., Cullinan, M., Jeffcoat, M., Mombelli, A., Murakami, S., Page, R., Papapanou, P., Tonetti, M. & Van Dyke, T. (1999) Consensus report: aggressive periodontitis. *Ann.Periodontol.*, **4**, 53.

Larjava, H., Sandberg, M. & Vuorio, E. (1989) Altered distribution of type I collagen mRNA in periodontal disease. *J.Periodontal Res.*, **24**, 171-177.

Lee, J. Y., Sojar, H. T., Bedi, G. S. & Genco, R. J. (1991) Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis fimbrillin: size, amino-terminal sequence, and antigenic heterogeneity. *Infect.Immun.*, **59**, 383-389.

Lehrnbecher, T., Foster, C. B., Zhu, S., Leitman, S. F., Goldin, L. R., Huppi, K. & Chanock, S. J. (1999) Variant genotypes of the low-affinity Fcγ receptors in two control populations and a review of low-affinity Fcγ receptor polymorphisms in control and disease populations. *Blood*, **94**, 4220-4232.

Linden, G. J. & Mullally, B. H. (1994) Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults. *J.Periodontol.*, **65**, 718-723.

Lindhe, J., Hamp, S. & Loe, H. (1973) Experimental periodontitis in the beagle dog. *J.Periodontal Res.*, **8**, 1-10.

Loe, H., Anerud, A., Boysen, H. & Morrison, E. (1986a) Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J.Clin.Periodontol.*, **13**, 431-445.

Loe, H. & Brown, L. J. (1991) Early onset periodontitis in the United States of America. *J.Periodontol.*, **62**, 608-616.

Loe, H., Theilade, E. & Jensen, S. B. (1965b) Experimental gingivitis in man. *J.Periodontol.*, **36**, 177-187.

Long, J. C., Nance, W. E., Waring, P., Burmeister, J. A. & Ranney, R. R. (1987) Early onset periodontitis: a comparison and evaluation of two proposed modes of inheritance. *Genet.Epidemiol.*, **4**, 13-24.

Loos, B. G., Leppers-Van de Straat FG, van de Winkel, J. G. & Van, d., V (2003) Fcgamma receptor polymorphisms in relation to periodontitis. *J.Clin.Periodontol.*, **30**, 595-602.

Loos, B. G. & Van der Velden, U. (2002) Genetics in relation to periodontitis. In *Clinical periodontology and implant dentistry*. eds. Lindhe, J., Karring, T., & Lang, N. P., pp. 387-399. Oxford: Blackwell Publishing.

Lovelace, B. M., Thompson, J. J. & Yukna, R. A. (1982) Evidence for local immunoglobulin synthesis in periodontitis. *J.Periodontol.*, **53**, 626-630.

Magnusson, I. & Walker, C. B. (1996) Refractory periodontitis or recurrence of disease. *J.Clin.Periodontol.*, **23**, 289-292.

Marazita, M. L., Burmeister, J. A., Gunsolley, J. C., Koertge, T. E., Lake, K. & Schenkein, H. A. (1994) Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. *J.Periodontol.*, **65**, 623-630.

McGuire, M. K. & Nunn, M. E. (1999) Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J.Periodontol.*, **70**, 49-56.

Meisel, P., Carlsson, L. E., Sawaf, H., Fanghaenel, J., Greinacher, A. & Kocher, T. (2001) Polymorphisms of Fc gamma-receptors RIIa, RIIIa, and RIIIb in patients with adult periodontal diseases. *Genes Immun.*, **2**, 258-262.

Melnick, M., Shields, E. D. & Bixler, D. (1976) Periodontosis: a phenotypic and genetic analysis. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.*, **42**, 32-41.

Melvin, W. L., Sandifer, J. B. & Gray, J. L. (1991) The prevalence and sex ratio of juvenile periodontitis in a young racially mixed population. *J.Periodontol.*, **62**, 330-334.

Michalowicz, B. S. (1994) Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J.Periodontol.*, **65**, 479-488.

Michalowicz, B. S., Aeppli, D., Virag, J. G., Klump, D. G., Hinrichs, J. E., Segal, N. L., Bouchard, T. J., Jr. & Pihlstrom, B. L. (1991) Periodontal findings in adult twins. *J.Periodontol.*, **62**, 293-299.

Michel, J., Gonzales, J. R., Wunderlich, D., Diete, A., Herrmann, J. M. & Meyle, J. (2001) Interleukin-4 polymorphisms in early onset periodontitis. *J.Clin.Periodontol.*, **28**, 483-488.

Mintz, K. P. & Fives-Taylor, P. M. (1994) Identification of an immunoglobulin Fc receptor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect.Immun.*, **62**, 4500-4505.

Moore, W. E., Holdeman, L. V., Smibert, R. M., Good, I. J., Burmeister, J. A., Palcanis, K. G. & Ranney, R. R. (1982) Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. *Infect.Immun.*, **38**, 651-667.

Moore, W. E. & Moore, L. V. (1994) The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol.2000*, **5**, 66-77.

Morrison, E. C., Ramfjord, S. P. & Hill, R. W. (1980) Short-term effects of initial, nonsurgical periodontal treatment (hygienic phase). *J.Clin.Periodontol.*, **7**, 199-211.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, **51 Pt 1**, 263-273.

- Murray, P. A. (1994) Periodontal diseases in patients infected by human immunodeficiency virus. *Periodontol.2000*, **6**, 50-67.
- Neely, A. L. (1992) Prevalence of juvenile periodontitis in a circumpubertal population. *J.Clin.Periodontol.*, **19**, 367-372.
- Nelson, R. G., Shlossman, M., Budding, L. M., Pettitt, D. J., Saad, M. F., Genco, R. J. & Knowler, W. C. (1990) Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care*, **13**, 836-840.
- Nevins, M. & Nevins, M. L. (1998) Genetic susceptibility to periodontal disease. *Dent.Today*, **17**, 94-99.
- Newman, M. G. & Socransky, S. S. (1977) Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J.Periodontal Res.*, **12**, 120-128.
- Newton, C. R. & Graham, A. (1997) *PCR*. Second Edition edition. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited.
- Nicu, E. A., Van, d., V, Everts, V., van Winkelhoff, A. J., Roos, D. & Loos, B. G. (2007) Hyper-reactive PMNs in FcgammaRIIa 131 H/H genotype periodontitis patients. *J.Clin.Periodontol.*, **34**, 938-945.
- Nikolopoulou-Papaconstantinou, A. A., Johannessen, A. C. & Kristoffersen, T. (1987) Deposits of immunoglobulins, complement, and immune complexes in inflamed human gingiva. *Acta Odontol.Scand.*, **45**, 187-193.
- Norderyd, O. (1998) Risk for periodontal disease in a Swedish adult population. Cross-sectional and longitudinal studies over two decades. *Swed.Dent.J.Suppl*, **132**, 1-67.
- Offenbacher, S. (1996) Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann.Periodontol.*, **1**, 821-878.

Osborne, J. M., Chacko, G. W., Brandt, J. T. & Anderson, C. L. (1994) Ethnic variation in frequency of an allelic polymorphism of human Fc gamma RIIA determined with allele specific oligonucleotide probes. *J.Immunol.Methods*, **173**, 207-217.

Page, R. C., Davies, P. & Allison, A. C. (1973) Effects of dental plaque on the production and release of lysosomal hydrolases by macrophages in culture. *Arch.Oral Biol.*, **18**, 1481-1495.

Page, R. C., Offenbacher, S., Schroeder, H. E., Seymour, G. J. & Kornman, K. S. (1997) Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol.2000*, **14**, 216-248.

Page, R. C. & Schroeder, H. E. (1976) Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*, **34**, 235-249.

Parkhill, J. M., Hennig, B. J., Chapple, I. L., Heasman, P. A. & Taylor, J. J. (2000) Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *J.Clin.Periodontol.*, **27**, 682-689.

Payne, J. B., Johnson, G. K., Reinhardt, R. A., Dyer, J. K., Maze, C. A. & Dunning, D. G. (1996) Nicotine effects on PGE2 and IL-1 beta release by LPS-treated human monocytes. *J.Periodontal Res.*, **31**, 99-104.

Platonov, A. E., Kuijper, E. J., Vershinina, I. V., Shipulin, G. A., Westerdaal, N., Fijen, C. A. & van de Winkel, J. G. (1998) Meningococcal disease and polymorphism of Fc gamma RIIa (CD32) in late complement component-deficient individuals. *Clin.Exp.Immunol.*, **111**, 97-101.

Poessel, C. (1939) *Parodontose-Therapie im Wandel der Zeiten. Schriftensammlung zum 60.Geburtstag Weskis*. Max Gehlen Verlag.

Porges, A. J., Redecha, P. B., Kimberly, W. T., Csernok, E., Gross, W. L. & Kimberly, R. P. (1994) Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIIa. *J.Immunol.*, **153**, 1271-1280.

Qiagen (1999) *HotStarTaq PCR Handbook*. Hilden: Qiagen GmbH.

Quinn, S. M., Zhang, J. B., Gunsolley, J. C., Schenkein, J. G., Schenkein, H. A. & Tew, J. G. (1996) Influence of smoking and race on immunoglobulin G subclass concentrations in early-onset periodontitis patients. *Infect.Immun.*, **64**, 2500-2505.

Rascu, A., Repp, R., Westerdaal, N. A., Kalden, J. R. & van de Winkel, J. G. (1997) Clinical relevance of Fc gamma receptor polymorphisms. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **815**, 282-295.

Rego, T. I. & Pinheiro, A. L. (1998) Manifestations of periodontal diseases in AIDS patients. *Braz.Dent.J.*, **9**, 47-51.

Reilly, A. F., Norris, C. F., Surrey, S., Bruchak, F. J., Rappaport, E. F., Schwartz, E. & McKenzie, S. E. (1994) Genetic diversity in human Fc receptor II for immunoglobulin G: Fc gamma receptor IIA ligand-binding polymorphism. *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, **1**, 640-644.

Reinhardt, R. A., Bolton, R. W., McDonald, T. L., DuBois, L. M. & Kaldahl, W. B. (1988) In situ lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites. *J.Periodontol.*, **59**, 656-670.

Rosan, B., Slots, J., Lamont, R. J., Listgarten, M. A. & Nelson, G. M. (1988) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fimbriae. *Oral Microbiol.Immunol.*, **3**, 58-63.

Saglie, F. R., Smith, C. T., Newman, M. G., Carranza, F. A., Jr., Pertuiset, J. H., Cheng, L., Auil, E. & Nisengard, R. J. (1986) The presence of bacteria in the oral epithelium in

periodontal disease. II. Immunohistochemical identification of bacteria. *J.Periodontol.*, **57**, 492-500.

Saito, I., Komiyama, K., Moro, I., Akachi, K., Shiomi, N., Ito, K., Murai, S. & Umemura, S. (1987) Ultrastructural and immunocytochemical characterization of polymorphonuclear leukocytes from gingival crevice in man. *J.Periodontol.*, **58**, 493-497.

Salvi, G. E., Lawrence, H. P., Offenbacher, S. & Beck, J. D. (1997) Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol.2000*, **14**, 173-201.

Sanders, L. A., Feldman, R. G., Voorhorst-Ogink, M. M., de Haas, M., Rijkers, G. T., Capel, P. J., Zegers, B. J. & van de Winkel, J. G. (1995) Human immunoglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. *Infect.Immun.*, **63**, 73-81.

Sanders, L. A., van de Winkel, J. G., Rijkers, G. T., Voorhorst-Ogink, M. M., de Haas, M., Capel, P. J. & Zegers, B. J. (1994) Fc gamma receptor IIa (CD32) heterogeneity in patients with recurrent bacterial respiratory tract infections. *J.Infect.Dis.*, **170**, 854-861.

Saxen, L. (1980a) Heredity of juvenile periodontitis. *J.Clin.Periodontol.*, **7**, 276-288.

Saxen, L. (1980b) Juvenile periodontitis. *J.Clin.Periodontol.*, **7**, 1-19.

Schenkein, H. A. (1988) The effect of periodontal proteolytic *Bacteroides* species on proteins of the human complement system. *J.Periodontal Res.*, **23**, 187-192.

Schnackenberg, L., Flesch, B. K. & Neppert, J. (1997) Linkage disequilibria between Duffy blood groups, Fc gamma IIa and Fc gamma IIIb allotypes. *Exp.Clin.Immunogenet.*, **14**, 235-242.

Schroeder, H. E. (1997) *Pathobiologie oraler Strukturen: Zähne, Pulpa, Parodont*. 3. überarbeitete Auflage edition. Basel: Karger.

Shapira, L., Eizenberg, S., Sela, M. N., Soskolne, A. & Brautbar, H. (1994) HLA A9 and B15 are associated with the generalized form, but not the localized form, of early-onset periodontal diseases. *J.Periodontol.*, **65**, 219-223.

Shapira, L., Stabholz, A., Rieckmann, P. & Kruse, N. (2001) Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-alpha promoter region in families with localized early-onset periodontitis. *J.Periodontal Res.*, **36**, 183-186.

Sheridan, J. F., Dobbs, C., Brown, D. & Zwillling, B. (1994) Psychoneuroimmunology: stress effects on pathogenesis and immunity during infection. *Clin.Microbiol.Rev.*, **7**, 200-212.

Sjodin, B., Matsson, L., Unell, L. & Egelberg, J. (1993) Marginal bone loss in the primary dentition of patients with juvenile periodontitis. *J.Clin.Periodontol.*, **20**, 32-36.

Skogen, B., Bellissimo, D. B., Hessner, M. J., Santoso, S., Aster, R. H., Newman, P. J. & McFarland, J. G. (1994) Rapid determination of platelet alloantigen genotypes by polymerase chain reaction using allele-specific primers. *Transfusion*, **34**, 955-960.

Slots, J. (1977a) Microflora in the healthy gingival sulcus in man. *Scand.J.Dent.Res.*, **85**, 247-254.

Slots, J. (1977b) The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scand.J.Dent.Res.*, **85**, 114-121.

Slots, J. (1979) Subgingival microflora and periodontal disease. *J.Clin.Periodontol.*, **6**, 351-382.

- Slots, J. (1986) Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. *J.Clin.Periodontol.*, **13**, 912-917.
- Slots, J. & Rams, T. E. (1991) New views on periodontal microbiota in special patient categories. *J.Clin.Periodontol.*, **18**, 411-420.
- Slots, J., Reynolds, H. S. & Genco, R. J. (1980) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect.Immun.*, **29**, 1013-1020.
- Slots, J., Zambon, J. J., Rosling, B. G., Reynolds, H. S., Christersson, L. A. & Genco, R. J. (1982) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Association, serology, leukotoxicity, and treatment. *J.Periodontal Res.*, **17**, 447-448.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1992) The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J.Periodontol.*, **63**, 322-331.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Dzink, J. L. & Hillman, J. D. (1988) Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiol.Immunol.*, **3**, 1-7.
- Sojar, H. T., Lee, J. Y., Bedi, G. S., Cho, M. I. & Genco, R. J. (1991) Purification, characterization and immunolocalization of fimbrial protein from *Porphyromonas (bacteroides) gingivalis*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **175**, 713-719.
- Spencer, R. (1994) Exploring brain interactions with the immune system: Corticosteroids and their receptors. *Mind Body Health*, **10**, 33.
- Sugita, N., Kobayashi, T., Ando, Y., Yoshihara, A., Yamamoto, K., van de Winkel, J. G., Miyazaki, H. & Yoshie, H. (2001) Increased frequency of FcγRIIIb-NA1 allele in periodontitis-resistant subjects in an elderly Japanese population. *J.Dent.Res.*, **80**, 914-918.

- Sundqvist, G., Figdor, D., Hanstrom, L., Sorlin, S. & Sandstrom, G. (1991) Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Scand.J.Dent.Res.*, **99**, 117-129.
- Suzuki, J. B., Collison, B. C., Falkler, W. A., Jr. & Nauman, R. K. (1984) Immunologic profile of juvenile periodontitis. II. Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and spore germination. *J.Periodontol.*, **55**, 461-467.
- Taguchi, A., Tanimoto, K., Suei, Y. & Wada, T. (1995) Tooth loss and mandibular osteopenia. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.*, **79**, 127-132.
- Takata, T. & Donath, K. (1988) The mechanism of pocket formation. A light microscopic study on undecalcified human material. *J.Periodontol.*, **59**, 215-221.
- Tangada, S. D., Califano, J. V., Nakashima, K., Quinn, S. M., Zhang, J. B., Gunsolley, J. C., Schenkein, H. A. & Tew, J. G. (1997) The effect of smoking on serum IgG2 reactive with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in early-onset periodontitis patients. *J.Periodontol.*, **68**, 842-850.
- Tanner, A. C. R. (1988) Is the specific plaquehypothesis still tenable? In *Periodontology today*. ed. Guggenheim B., Basel: Karger.
- Tax, W. J., Hermes, F. F., Willems, R. W., Capel, P. J. & Koene, R. A. (1984) Fc receptors for mouse IgG1 on human monocytes: polymorphism and role in antibody-induced T cell proliferation. *J.Immunol.*, **133**, 1185-1189.
- Tew, J. G., Zhang, J. B., Quinn, S., Tangada, S., Nakashima, K., Gunsolley, J. C., Schenkein, H. A. & Califano, J. V. (1996) Antibody of the IgG2 subclass, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and early-onset periodontitis. *J.Periodontol.*, **67**, 317-322.

- Theilade, E. (1986) The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J.Clin.Periodontol.*, **13**, 905-911.
- Thorstensson, H. & Hugoson, A. (1993) Periodontal disease experience in adult long-duration insulin-dependent diabetics. *J.Clin.Periodontol.*, **20**, 352-358.
- Tonetti, M. S. & Mombelli, A. (1999) Early-onset periodontitis. *Ann.Periodontol.*, **4**, 39-53.
- Travis, J., Pike, R., Imamura, T. & Potempa, J. (1997) Porphyromonas gingivalis proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J.Periodontal Res.*, **32**, 120-125.
- Tse, W. Y., Abadeh, S., McTiernan, A., Jefferis, R., Savage, C. O. & Adu, D. (1999) No association between neutrophil FcγRIIa allelic polymorphism and anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-positive systemic vasculitis. *Clin.Exp.Immunol.*, **117**, 198-205.
- van de Winkel, J. G. & Capel, P. J. (1993) Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol.Today*, **14**, 215-221.
- van der Pol, W. & van de Winkel, J. G. (1998) IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease. *Immunogenetics*, **48**, 222-232.
- van der Pol, W. L., van den Berg, L. H., Scheepers, R. H., van der Bom, J. G., van Doorn, P. A., van Koningsveld, R., van den Broek, M. C., Wokke, J. H. & van de Winkel, J. G. (2000) IgG receptor IIa alleles determine susceptibility and severity of Guillain-Barre syndrome. *Neurology*, **54**, 1661-1665.
- Van Dyke, T. E., Bartholomew, E., Genco, R. J., Slots, J. & Levine, M. J. (1982) Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. *J.Periodontol.*, **53**, 502-508.

- Van Dyke, T. E., Wilson-Burrows, C., Offenbacher, S. & Henson, P. (1987)
Association of an abnormality of neutrophil chemotaxis in human periodontal disease
with a cell surface protein. *Infect.Immun.*, **55**, 2262-2267.
- van Schie, R. C. & Wilson, M. E. (2000) Evaluation of human FcγRIIA (CD32)
and FcγRIIIB (CD16) polymorphisms in Caucasians and African-Americans
using salivary DNA. *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, **7**, 676-681.
- van Winkelhoff, A. J., Appelmelk, B. J., Kippuw, N. & de Graaff, J. (1993) K-antigens
in *Porphyromonas gingivalis* are associated with virulence. *Oral Microbiol.Immunol.*, **8**,
259-265.
- Waldrop, T. C., Anderson, D. C., Hallmon, W. W., Schmalstieg, F. C. & Jacobs, R. L.
(1987) Periodontal manifestations of the heritable Mac-1, LFA-1, deficiency syndrome.
Clinical, histopathologic and molecular characteristics. *J.Periodontol.*, **58**, 400-416.
- Warmerdam, P. A., Nabben, N. M., van de Graaf, S. A., van de Winkel, J. G. & Capel,
P. J. (1993) The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor IIC gene is a result
of an unequal crossover event. *J.Biol.Chem.*, **268**, 7346-7349.
- Warmerdam, P. A., van de Winkel, J. G., Gosselin, E. J. & Capel, P. J. (1990)
Molecular basis for a polymorphism of human Fc gamma receptor II (CD32).
J.Exp.Med., **172**, 19-25.
- Warmerdam, P. A., van de Winkel, J. G., Vlug, A., Westerdaal, N. A. & Capel, P. J.
(1991) A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma
receptor II is critical for human IgG2 binding. *J.Immunol.*, **147**, 1338-1343.
- Wheeler, T. T., McArthur, W. P., Magnusson, I., Marks, R. G., Smith, J., Sarrett, D. C.,
Bender, B. S. & Clark, W. B. (1994) Modeling the relationship between clinical,
microbiologic, and immunologic parameters and alveolar bone levels in an elderly
population. *J.Periodontol.*, **65**, 68-78.

- Wilson, M. E., Bronson, P. M. & Hamilton, R. G. (1995) Immunoglobulin G2 antibodies promote neutrophil killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect.Immun.*, **63**, 1070-1075.
- Wilson, M. E. & Kalmar, J. R. (1996) Fc gamma RIIa (CD32): A potential marker defining susceptibility to localized juvenile periodontitis. *J.Periodontol.*, **67**, 323-331.
- Wolff, L., Dahlen, G. & Aepli, D. (1994) Bacteria as risk markers for periodontitis. *J.Periodontol.*, **65**, 498-510.
- Yamamoto, K., Kadowaki, T., Okamoto, K., Yoneda, M., Nakayama, K., Misumi, Y. & Ikehara, Y. (1996) Structure and function of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain) as a major periodontal pathogenic factor from *porphyromonas gingivalis*. *Adv.Exp.Med.Biol.*, **389**, 33-42.
- Yamamoto, K., Kobayashi, T., Grossi, S., Ho, A. W., Genco, R. J., Yoshie, H. & De Nardin, E. (2004) Association of Fc gamma receptor IIa genotype with chronic periodontitis in Caucasians. *J.Periodontol.*, **75**, 517-522.
- Yee, A. M. F., Ng, S. C., Sobel, R. E. & Salmon, J. E. (1997) Fc gamma RIIA polymorphism as a risk factor for invasive pneumococcal infections in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, **40**, 1180-1182.
- Zambon, J. J. (1985) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J.Clin.Periodontol.*, **12**, 1-20.
- Zambon, J. J., Slots, J. & Genco, R. J. (1983) Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect.Immun.*, **41**, 19-27.
- Zhang, Y., Lundgren, T., Renvert, S., Tatakis, D. N., Firatli, E., Uygur, C., Hart, P. S., Gorry, M. C., Marks, J. J. & Hart, T. C. (2001) Evidence of a founder effect for four

cathepsin C gene mutations in Papillon-Lefevre syndrome patients. *J.Med.Genet.*, **38**, 96-101.

9. Anhang

9.1. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Einige zelluläre Mechanismen der Pathogenese der Parodontitis	15
Abbildung 2: PCR-Analyse für 131R und 131H.	52
Abbildung 3: FcγRIIa-Genotypen: 1+2=131H/H; 3+4=131R/R; 5+6=131R/H	55
Abbildung 4: Häufigkeit der FcγRIIa-Genotypen.....	56
Abbildung 5: Verteilung der FcγRIIa-Genotypen bei Probanden und Patienten.....	57
Abbildung 6: Altersverteilung in Jahren in den beiden Gruppen	58
Abbildung 7: Plaqueindex (PI) in % in den beiden Gruppen.....	59
Abbildung 8: Papillenblutungsindex (PBI) in % in den beiden Gruppen	60
Abbildung 9: Sondierungstiefe (ST) in mm in den beiden Gruppen	61
Abbildung 10: Sondierungsblutung (SB) in % in den beiden Gruppen.....	62
Abbildung 11: Attachmentlevel (AL) in mm in den beiden Gruppen	63

9.2. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: PCR-Komponenten 131R	42
Tabelle 2: PCR-Komponenten 131H.....	47
Tabelle 3: Pipettierschema und PCR-Programm für den Nachweis des 131R-Allels.....	53
Tabelle 4: Pipettierschema und PCR-Programm für den Nachweis des 131H-Allels	54
Tabelle 5: Verteilung der FcγRIIa-Genotypen und Häufigkeit der Allele	56
Tabelle 6: Auswertung des Alters der beiden Gruppen in Jahren	58
Tabelle 7: Auswertung der Plaqueindizes der beiden Gruppen in %	59
Tabelle 8: Auswertung der Papillenblutungsindizes der beiden Gruppen in %	60
Tabelle 9: Auswertung der Sondierungstiefe der beiden Gruppen in mm	61
Tabelle 10: Auswertung der Sondierungsblutungswerte der beiden Gruppen in %	62
Tabelle 11: Auswertung des Attachmentlevels der beiden Gruppen in mm	63
Tabelle 12: Gegenüberstellung der klinischen Daten in den verschiedenen Gruppen	64
Tabelle 13: Klinische Daten in den verschiedenen Gruppen und FcγRIIa-Genotypen.....	65

9.3. Erklärung

Erklärung:

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei der von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchung habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Achim Roll

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

9.5. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jörg Meyle, Leiter der Abteilung Parodontologie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der JLU Giessen danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Josef Gonzales für die Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit und insbesondere für die Unterstützung nach dem Weggang von Herrn Dr. Jörg Michel aus oben genannter Abteilung.

Bei Herrn Dr. Jörg Michel möchte ich mich herzlich für die Betreuung während der Durchführung der Versuche im Labor bedanken. Ohne seine Hilfe bei der Einarbeitung in die Methode, seine konstruktive Kritik und Hilfe bei der Lösung auftretender Probleme wäre der praktische Teil dieser Arbeit so nicht durchführbar gewesen.

Herrn Helge Hudel vom Institut für Medizinische Informatik der JLU Giessen, AG Medizinische Statistik danke ich für die freundliche Unterstützung und Beratung bei der statistischen Analyse der Daten.

Weiterer Dank gebührt all den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Parodontologie des Zentrums für ZMK der JLU Giessen, die mir in irgendeiner Form hilfreich zur Seite standen.

Mein tiefster Dank gilt meiner Freundin Dr. Julia Beuche, die durch ihre dauerhafte Unterstützung, ihre ständige Hilfsbereitschaft und ihr Verständnis für all die Probleme, die im Rahmen einer solchen Arbeit auftreten, zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen hat. Vielen Dank für den oft notwendigen „Tritt in den Hintern“ zur rechten Zeit.

Aufrichtigster Dank gilt meinen Eltern, da Sie mich zu jeder Zeit ohne Einschränkungen während meiner gesamten Ausbildungszeit in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und mir immer zur Seite standen. Ohne diese umfassende Unterstützung wäre ein solcher Werdegang niemals möglich gewesen.

édition scientifique
VVS LAUFERSWEILER VERLAG

VVS LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5479-2



9 783835 479547

